



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL CANNABIDIOL, ESTRIGOLACTONAS Y OTROS PRODUCTOS
NATURALES SOBRE DIFERENTES DIANAS FARMACOLÓGICAS EN DERMATOLOGÍA.
DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS DE USO TÓPICO**

*Study of Cannabidiol, Strigolactones and other natural products on pharmacological targets in
dermatology. New products development for topical use.*

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina por

Estrella Millán Ortega

Directores

Eduardo Muñoz Blanco

Marco Antonio Calzado Canale

Córdoba, 21 de Julio de 2020

TITULO: *Estudio del Cannabidiol, Estrigolactonas y otros productos naturales sobre diferentes dianas farmacológicas en dermatología. Desarrollo de nuevos productos de uso tópico*

AUTOR: *Estrella Millán Ortega*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio del Cannabidiol, Estrigolactonas y otros productos naturales sobre diferentes dianas farmacológicas en dermatología. Desarrollo de nuevos productos de uso tópico.

DOCTORANDO/A: Estrella Millán Ortega

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda ha cumplido de forma muy eficiente con todos los objetivos propuestos en su plan de investigación. Así, ha colaborado de una manera importante en el desarrollo de una plataforma tecnológica para el cribado de ingredientes de uso tópico y sus resultados han sido publicados en varios artículos científicos en Q1. Estas publicaciones, aunque son parte indirecta de la tesis, demuestran la validez de la plataforma desarrollada. Además, ha identificado nuevos derivados del estrigol con potencial aplicación en patologías dérmicas y ha identificado a nivel transcriptómico y proteómico el efecto del Cannabidiol sobre queratinocitos humanos. Esto le ha permitido publicar otros 2 artículos científicos y una revisión en revistas Q1, dos de ellos de primera autora. Aunque esta no es una Tesis industrial si tiene un componente importante de investigación translacional ya que su Tesis la ha desarrollado siendo empleada de la empresa InnoHealth S.L. Como consecuencia también ha desarrollado nuevas combinaciones de ingredientes de uso tópico que le ha permitido solicitar dos patentes europeas como inventora. También ha participado en varios congresos nacionales y ha completado de forma eficiente las actividades asociadas a su plan de formación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de Julio de 2020

Firma de los directores

Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

Fdo.: Marco Antonio Calzado Canale

*El verdadero viaje del aprendizaje consiste no en
buscar nuevos paisajes, sino en mirar con nuevos ojos*
(Marcel Proust)

No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho
(Aristóteles)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Eduardo y Marco, gracias por enseñarme, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y de hacerme ver que en la ciencia se aprende de los resultados buenos y de los no tan buenos.

A todas las personas que forman o han formado parte en algún momento del grupo GC04 de Inflamación y Cáncer del IMIBIC. Gracias a todos los compañeros que lleváis trabajando más tiempo, habéis sido todo un referente y compartido vuestra experiencia para que pudiera aplicarla en mi investigación. Gracias también a los más jóvenes que habéis aportado multitud de preguntas inquietas permitiendo ver las situaciones desde diferentes puntos de vista. Todos y cada uno de vosotros habéis colaborado a que esta tesis se haga realidad. También resaltar que ha sido una grata experiencia vuestra introducción a las costumbres y fiestas cordobesas, me he sentido como una más y los años allí, en el sur, han sido y serán inolvidables. En especial quería agradecer a Juan Antonio que empezó siendo mi mentor en las técnicas y manejo de laboratorio y terminó siendo un gran amigo. Juntos vimos nacer la plataforma SimDerma y gracias a Paloma, Ana y el grupo de la Dra. María Ángeles fue hecha realidad. También quería destacar a Adela, Jon y Víctor por su colaboración en el desarrollo de ensayos con CBD, sin vosotros hubiese sido difícil abarcar el planteamiento de los experimentos que surgieron a partir del análisis que realizó Martín, nuestro bioinformático favorito, gracias también a ti por dar sentido a los datos de genes y proteínas de difícil comprensión.

La ciencia es más productiva cuando hay un intercambio de conocimiento a nivel internacional, por ese motivo me gustaría agradecer también al Dr. Giovanni Appendino y su grupo de la Universidad del Piamonte Oriental por la estrecha colaboración que hemos tenido siempre, así como la tenida con el Dr. Laureano de la Vega y su grupo de investigación de la Universidad de Dundee.

Gracias a innoHealth Group, formada por un grupo de personas realmente fascinante, con conocimientos en diferentes campos que permiten que hacer ciencia sea más fácil. Edu, gracias por hacerme formar parte de este equipo y darme la oportunidad de ser más profesional, así como de enseñarme a mirar la investigación desde un punto de vista más práctico y directo.

En el ámbito personal, me gustaría recordar a todos los amigos que la biología ha puesto en mi camino en algún momento y que, gracias a ella seguimos juntos. También a aquellos que han formado parte de las experiencias de mi infancia y adolescencia. Porque esos momentos desenfadados, alegres y de risas te dan fuerza para superar cualquier obstáculo que se presenta.

Me gustaría agradecer a mi familia, cada vez más grande, sin vosotros yo no sería como soy hoy. Gracias a las personas que, aunque ya no están, siempre lo estarán, a los nuevos miembros que dan alegría y amplían la familia como espejos de lo que fuimos nosotros. A todos mis tíos/as y mis primos/as, parte de esta tesis es vuestra, porque grandes momentos de mi vida han sido con vosotros. A mi familia política, gracias por acogerme como parte de vosotros, por los consejos, por las comidas familiares que se alargan en juegos y por todos esos momentos que hemos pasado juntos y los que nos quedan por pasar.

Recuerdo con cariño a mi *sister*, tú practicabas tu futuro como profe conmigo, pero nunca me dejaste probar mi futuro como bióloga contigo, ahora lo entiendo. Muchas gracias por todos los momentos que hemos pasado y que compartimos juntas, son inolvidables, seguiremos haciéndolo.

En especial quería agradecer a mis padres, gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, por insistir en que debo ser lo que quiera ser sin tener en cuenta los obstáculos que haya que vencer, por creer en mí desde que nací y seguir haciéndolo, por darme la fuerza y las experiencias que me hacen ser así.

Y, por último, gracias a Víctor, la persona que me complementa, me apoya y me hace más fuerte cada día. La biología también nos unió a nosotros hace ya varios años y desde ese momento hemos sido uno. Tanto en el trabajo, como en la vida personal formamos un gran equipo, esta tesis no hubiese sido posible sin tu apoyo y comprensión.

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Índice.....	11
Abreviaturas....	17
Resumen.....	21
I.Introducción	25
1. Estructura, organización y composición de la piel	27
1.1 Epidermis.....	27
1.2 Dermis	30
2. Fisiología de la piel	30
2.1 Barrera física.....	31
2.2 Función inmunológica	31
2.2.1 Tejido linfóide asociado a la piel (SALT).....	31
2.2.2 Microbiota cutánea	33
2.3 Hidratación cutánea	33
2.4 Protección frente a radiación ultravioleta.....	34
2.5 Función sensorial.....	35
2.5.1 Receptores cutáneos	35
2.5.2 Receptores celulares con función sensorial: receptores de potencial transitorio	36
2.6 Otras funciones dependientes de receptores celulares implicadas en la homeostasis de la piel	37
2.6.1 Sistema endocannabinoide	37
2.6.2 Receptores activados por proliferadores del peroxisoma	39
3. Principales procesos biológicos inducidos en las patologías de la piel.....	40
3.1 Inflamación.....	40
3.2 Estrés oxidativo	42

3.3 Disrupción de la barrera cutánea	43
4. Principales patologías de la piel	44
4.1 Dermatitis atópica.....	44
4.2 Acné.....	47
4.3 Trastornos pigmentarios de la piel	50
5. Ingredientes naturales.....	51
5.1 Cannabidiol.....	52
5.2 Estrigolactonas	53
II. Objetivos.....	57
III. Materiales y Métodos.....	61
1. Líneas celulares	63
2. Transfección transitoria	64
3. Determinación de la actividad transcripcional por luminiscencia.....	64
4. Evaluación de la citotoxicidad y la proliferación	66
5. Ensayo de cicatrización de la herida.....	66
6. Medida de los niveles de ROS.....	67
7. Ensayo de autofagia.....	67
8. Ensayo de agonismo y antagonismo del receptor vanilloide 1 (TVR-1).....	67
9. Medición de la oxidación total	68
10. Actividad tirosinasa en melanocitos	68
11. Producción de melanina.....	68
12. Actividad hialuronidasa.....	69
13. Detección de proteínas por <i>Western Blot</i>	69
14. Modelo animal para el estudio de los efectos del CBD en piel.....	70
15. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	71
16. Estudio histológico de las muestras de piel	72
17. Ensayo clínico de reducción de la hiperpigmentación	72

18. Eficacia antimicrobiana del CBD	73
19. Análisis transcriptómico (RNA-Seq).....	73
20. Análisis proteómico (SWATH LC-MS/MS).....	74
21. Análisis de datos transcriptómico y proteómicos	75
22. Análisis de los datos de la plataforma SimDerma.....	76
23. Análisis estadístico	77
IV. Resultados	79
1. La plataforma de cribado SimDerma como herramienta para la detección de actividades de interés dermatológico.....	81
1.1 Clasificación de los ingredientes testados en la plataforma SimDerma.....	84
1.2 Análisis de los ingredientes testados en SimDerma según su actividad.....	85
2. Estudio de los efectos biológicos del CBD en piel	89
2.1 Efecto antioxidante del CBD en queratinocitos	91
2.2 Análisis transcriptómico y proteómico del CBD sobre queratinocitos primarios	92
2.3 Efectos del CBD sobre la ruta molecular de NRF2.....	94
2.4 Efecto del CBD sobre genes dependientes de la ruta de MAFB	96
2.5 El CBD incrementa la proliferación y diferenciación epidérmica	98
3. Combinaciones basadas en CBD para el tratamiento de patologías de la piel	101
3.1 Estudio de los efectos de la combinación C-DA para su potencial aplicación en la dermatitis atópica	103
3.1.1 C-DA presenta actividad antioxidante y reduce los niveles de ROS en queratinocitos.....	105
3.1.2 C-DA es capaz de inhibir la transcripción de NF- κ B inducida por TNF- α en fibroblastos.....	107
3.1.3 C-DA actúa como agonista de PPAR α	108
3.1.4 Actividad antagonista para TRPV-1 de la combinación C-DA.....	109

3.1.5 C-DA induce la transcripción del gen de la FLG en queratinocitos.....	110
3.2 Efectos de C-AC para su potencial aplicación en acné	111
3.2.1 La combinación C-AC muestra capacidad antioxidante e inhibitoria de ROS en queratinocitos	113
3.2.2 El tratamiento con C-AC reduce la transcripción de NF- κ B inducida por TNF- α en fibroblastos.....	115
3.2.3 C-AC induce HIF-1 α en queratinocitos favoreciendo la respuesta inmune.....	116
3.2.4 El extracto de <i>Panax ginseng</i> actúa como cicatrizante en queratinocitos	117
3.2.5 CBD inhibe el crecimiento de <i>P. acnes</i> , mientras que la combinación C-AC reduce los efectos derivados de la infección por <i>P. acnes</i> al inhibir la actividad de la enzima hialuronidasa	118
3.3 La combinación C-HP inhibe la hiperpigmentación de la piel.....	120
3.3.1 C-HP disminuye la producción de melanina e inhibe la tirosinasa	121
3.3.2 C-HP es capaz de inhibir el estrés oxidativo en queratinocitos.....	123
3.3.3 Inducción de la autofagia después del tratamiento con C-HP	124
3.3.4 Efecto despigmentante del tratamiento tópico con C-HP.....	125
4. Efecto de las estrigolactonas sobre los principales procesos biológicos inducidos en patologías de la piel.....	129
4.1 Estudio de los efectos del estrigol y sus derivados sobre dianas biológicas de interés dermatológico	131
4.2 El estrigol y el compuesto 14 poseen efecto antioxidante en queratinocitos	132
4.3 El compuesto 14 posee efectos antiinflamatorios.....	133
V. Discusión	137
VI. Conclusiones	151
VII. Referencias bibliográficas.....	155
VIII. Anexo	183

ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurónico
AK	Ácido kójico
AMP	Péptido antimicrobiano
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
CB _{1/2}	Receptor cannabinoide tipo 1/2
CBD	Cannabidiol
CK16	Citoqueratina 16
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DA	Dermatitis atópica
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EGCg	Epigallocatequina galato
ERK	Quinasa reguladora por señal extracelular
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Agencia de medicamentos y alimentación de los Estados Unidos.
FLG	Filagrina
H ₂ DCFDA	2,7-diclorodihidrofluoresceína
HEK	Queratinocitos epidérmicos humanos
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia
HMOX1	Hemo oxigenasa-1
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina

I κ B	Inhibidor de κ B
IFN	Interferón
IKK	Complejo I κ B quinasa
IL	Interleuquina
JAK	Quinasas Janus
JNK	Quinasa c-Jun NH ₂ terminal
L-DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MARE	Elementos de respuesta a Maf
MIFT	Factor de transcripción asociado a microftalmia
NAC	N-acetil cisteína
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras <i>kappa</i> de las células B activadas
NMF	Factor de hidratación natural
NQO1	Quinona oxidorreductasa 1
NRF2	Factor de transcripción nuclear eritroide-2
PPAR	Receptores activados por proliferadores del peroxixoma
PSORS1	Gen de susceptibilidad a psoriasis 1
RLU	Unidades relativas de luz
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel
SEC	Sistema endocannabinoide
SL	Estrigolactona
SQSTM1	Sequestosome 1
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TBHQ	Tert-butil hidroquinona
TBHP	Hidroperóxido de tert-butilo
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPV-1	Receptor de potencial transitorio vanilloide clase 1
TXNRD1	Tiorredoxina reductasa
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Las afecciones dermatológicas como la dermatitis atópica, el acné, trastornos de hiperpigmentación o la psoriasis presentan una elevada prevalencia en la sociedad. Para los casos más severos se suele recurrir a fármacos cuyo uso prolongado acarrea efectos secundarios. Por esta razón, está en auge la búsqueda de tratamientos tópicos basados en ingredientes naturales cuyos efectos adversos son mínimos. En este sentido, el principal objetivo fue el desarrollo de una plataforma *in vitro* denominada SimDerma para el análisis masivo de ingredientes y sus efectos en dianas moleculares relacionadas con patologías de la piel.

De los ingredientes testados, se encontraron actividades potencialmente interesantes en dermatología en el cannabidiol (CBD) y las estrigolactonas. Por un lado, el CBD destacó por su potencial antioxidante induciendo la ruta molecular de Bach1/Nrf2 y la expresión de genes como SQSTM1/p62 o HMOX1 que participan en la respuesta de reducción de estrés oxidativo. Además, el tratamiento con CBD favorece la diferenciación y proliferación epidérmica incrementando el grosor de la epidermis. Por otro lado, se encontró que tanto el estrigol como su derivado, el compuesto 14, inhibieron la formación de especies reactivas de oxígeno y promovieron la inducción de Nrf2. Cabe destacar que a diferencia del estrigol, el compuesto 14 presentó actividad antiinflamatoria por inhibición de NF- κ B y STAT3.

Para la realización de tratamientos tópicos frente a patología cutáneas, se hicieron combinaciones basadas en CBD junto con otros ingredientes naturales. En primer lugar, la combinación C-DA tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios, agonista de PPAR α , inductor de filagrina y antagonista de TRPV-1 lo que la convierte en una prometedora opción para paliar la sintomatología de la dermatitis atópica. En segundo lugar, la combinación C-AC, podría contrarrestar los efectos originados por el acné al mostrar propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como inducir la expresión de HIF-1 α e inhibir la actividad de la enzima hialuronidasa. En último lugar, la combinación C-HP es capaz de disminuir la melanogénesis a través de la inhibición de la enzima tirosinasa, el incremento de la autofagia y, además, reduce el estrés oxidativo, por lo que podría ser un tratamiento para zonas de piel afectadas por trastornos hiperpigmentarios

En conclusión, los datos de los ingredientes naturales obtenidos en SimDerma validan el uso de esta herramienta para el desarrollo de combinaciones prometedoras como tratamiento tópico frente a alteraciones dermatológicas.

ABSTRACT

Skin diseases as atopic dermatitis, acne, hyperpigmentary disorders or psoriasis have a high prevalence in the worldwide. In the most severe cases, the prolonged use of drugs produces side effects. For this reason, the search of topical treatments based on natural ingredients is increasing due to their minimal adverse effects. In this sense, the main objective was an *in vitro* platform development known as SimDerma for testing massive ingredients and their effects on molecular targets related to skin pathologies.

Of all tested ingredients, CBD and strigolactones showed potentially interesting activities in dermatology. On the one hand, CBD has an antioxidant effect by inducing the Bach1/Nrf2 molecular pathway and the expression of genes such as SQSTM1/p62 and HMOX1 which participate in the reduction of oxidative stress response. In addition, CBD treatment promotes epidermal differentiation and proliferation, increasing the epidermis thickness. On the other hand, strigol and its derivate, compound 14, triggered the inhibition of reactive oxygen species formation and Nrf2 induction. It is important to note that unlike strigol, compound 14 presented anti-inflammatory activity by NF- κ B and STAT3 inhibition.

Combinations based on CBD added to other natural ingredients were created to develop topical treatments against cutaneous pathologies. First, C-DA combination has antioxidant, anti-inflammatory, PPAR α agonism, filaggrin induction, and TRPV-1 antagonism effects, being a promising option for improving atopic dermatitis symptoms. Second, C-AC combination could decrease the effects caused by acne due to antioxidant and anti-inflammatory properties, as well as, HIF-1 α induction and inhibition of hyaluronidase enzyme activity. Finally, C-HP combination is able to decrease melanogenesis by tyrosinase enzyme inhibition, autophagy increase, and also oxidative stress inhibition, therefore, it could be a treatment of skin areas affected by hyperpigmentary disorders.

In conclusion, the data of the natural ingredients obtained in SimDerma validate the use of this tool for the development of promising combinations as topical treatment against dermatological disorders.

I.Introducción

1. Estructura, organización y composición de la piel

El sistema tegumentario es el mayor órgano del cuerpo (15 % del peso corporal) y está formado por la piel y los anexos que incluyen: folículos pilosos, uñas y glándulas sudoríparas y sebáceas.

La piel está formada por dos capas: la epidermis, más exterior; y la dermis, más gruesa y profunda que se localiza por encima de la hipodermis. La epidermis y la dermis colaboran en la creación de una matriz extracelular, permitiendo un sistema de comunicación entre ellas. Ambas capas se encuentran separadas por la membrana basal que está constituida por colágenos, lamininas y proteoglicanos de heparán sulfato formando un entramado.

1.1 Epidermis

La epidermis es un epitelio en continua renovación formado mayoritariamente por queratinocitos, los cuales sintetizan principalmente queratinas que son un tipo de filamento intermedio del citoesqueleto. La morfología del queratinocito no es constante a lo largo de su vida, sino que va sufriendo modificaciones progresivas en un proceso conocido como queratinización, gracias al cual alcanzan la parte superficial de la piel donde mueren y se desprenden en forma de escamas. La epidermis se divide en cinco estratos que, desde el más profundo hasta el más superficial, se denominan: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Fig. 1) (1).

El **estrato basal o germinativo** está formado por una sola capa de queratinocitos con forma cúbica y núcleo ovalado. Cabe destacar, que es el único estrato en el que los queratinocitos presentan actividad mitótica y a partir de aquí comienza la queratinización diferenciándose y migrando hacia capas externas de la epidermis (2). En este estrato, junto a los queratinocitos, existen melanocitos y células de Merkel cuyos gránulos neurosecretores forman parte de la respuesta neuroendocrina (3).

El **estrato espinoso** consta de 8-10 capas de queratinocitos que presentan una morfología poliédrica irregular. Recibe la denominación de espinoso debido a la presencia de prolongaciones citoplasmáticas con apariencia de pequeñas espinas causadas por las uniones desmosómicas entre células colindantes. Entre los

queratinocitos de esta capa se localizan las células de Langerhans que son células dendríticas presentadoras de antígenos (4).

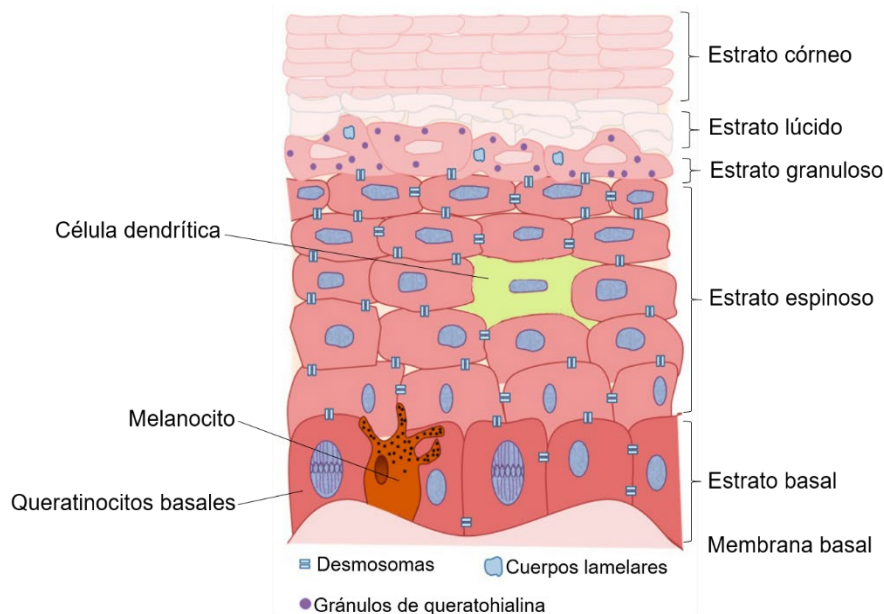


Figura 1. Principales componentes de la epidermis y los cinco estratos que la constituyen. Modificado de Janus y cols. Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Signalling Pathways in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*, 2017.

A continuación, se encuentra el **estrato granuloso** constituido por 3-5 capas de queratinocitos que contienen en su citoplasma gránulos de queratohialina formados por filamentos de queratina y gránulos lamelares formados por glucosil ceramidas, hidrolasas y lípidos (4).

El **estrato lúcido** sólo se encuentra en las regiones donde la piel es más gruesa (palma de las manos y los pies). Está formado por 3-5 capas de queratinocitos muertos que carecen de límites claramente diferenciados. Los queratinocitos aparecen embebidos en una sustancia aceitosa originada por la exocitosis de los gránulos lamelares. La eleidina es un componente fundamental de este estrato siendo un producto de la transformación de la queratohialina que, a su vez, es transformada en queratina en el estrato córneo (4).

El **estrato córneo** es el más exterior y es donde finaliza el proceso de queratinización, ya que los queratinocitos alcanzan su máxima diferenciación denominándose corneocitos. Este estrato está formado por 20-30 capas de corneocitos caracterizados por ser células muertas anucleadas, sin orgánulos citoplasmáticos, con aspecto escamoso y llenas de queratina. Los corneocitos se encuentran en una matriz de

lípidos dispuestos en una estructura organizada que permite ejercer una acción de compactación entre dichas células (5). La membrana celular de estos corneocitos se reemplaza por una envoltura proteica de filamentos de queratina unidos covalentemente, proporcionando una estructura flexible e insoluble que protege a las células subyacentes. Los corneocitos se unen entre ellos por un tipo de desmosomas denominado corneodesmosomas los cuales presentan una estructura transmembrana y unas proteínas específicas proporcionando mayor fuerza al estrato (6). A lo largo de este proceso de queratinización tienen un papel fundamental dos proteínas: la queratina y la filagrina (FLG).

- **Queratina:** Forma heterodímeros que a su vez se unen formando tetrámeros denominados protofilamentos. Varios protofilamentos se empaquetan para dar lugar a protofibrillas las cuales se enroscan entre ellas en hélice originando el filamento intermedio, el cual es el elemento estructural del citoplasma de las células. Los filamentos de queratina se extienden desde los desmosomas hasta la membrana nuclear dando resiliencia y resistencia. Además, las queratinas también están involucradas en la proliferación celular, la migración, la adhesión y procesos inflamatorios (7).

- **Filagrina:** Su precursor se denomina profilagrina y su síntesis comienza en los queratinocitos del estrato granuloso. Cuando este precursor es liberado al citoplasma, es modificado mediante reacciones de desfosforilación y proteasas que en presencia de calcio causan su degradación y la formación de monómeros de FLG activa. Gracias a su carga catiónica, la FLG es capaz de unirse fuertemente a filamentos de queratina compactándolos, lo que provoca el aplanamiento de la célula característico del estrato córneo (Fig. 2) (8, 9).

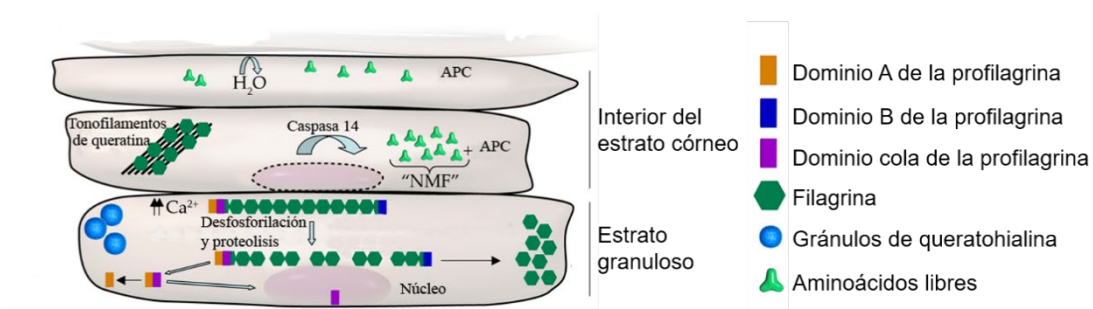


Figura 2. Síntesis de filagrina. Modificado de O'Regan y cols. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2009.

1.2 Dermis

La dermis tiene un grosor de 2-4 mm. Los fibroblastos son las células predominantes de la dermis, junto a ellos hay otros tipos celulares como mastocitos, linfocitos y macrófagos que están involucrados en la respuesta inmune. Estas células están distribuidas en una matriz de colágeno y elastina cuya síntesis es llevada a cabo por los fibroblastos.

- **Colágeno:** Aunque hay diferentes tipos de colágeno, el de tipo I es el más abundante en la piel, es codificado por los genes COL1A1 y COL1A2 dando lugar a una proteína de 1400 aminoácidos cuya secuencia es rica en glicinas, prolinas e hidroxiprolinas. El colágeno se sintetiza formando cadenas que llegan al retículo endoplasmático donde sufren reacciones de hidroxilación y glicosilación, uniéndose entre ellas y originando triples hélices. Estas se desplazan al aparato de Golgi produciéndose reacciones de sulfatación y fosforilación de algunos de sus residuos, dando lugar al procolágeno que es liberado al espacio extracelular a través de vesículas secretoras. Una vez allí, los extremos son hidrolizados y las triples hélices se ensamblan entre ellas formando fibrillas que, a su vez, se unirán dando lugar a las fibras de colágeno (10).

- **Elastina:** La elastina es la encargada de proporcionar elasticidad a la piel ya que junto a otras proteínas como las microfibrillas forman las fibras elásticas. La tropoelastina es su precursor, y es codificado por el gen ELN que se traduce en una secuencia de aminoácidos entre los que abundan la alanina y la lisina. Los polipéptidos de tropoelastina se van uniendo por enlaces intermoleculares covalentes llamados desmosinas generando polímeros de elastina altamente interconectados (11).

En la dermis también se encuentran vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminaciones nerviosas, folículos pilosos y glándulas sudoríparas y sebáceas (12).

2. Fisiología de la piel

La piel es la primera barrera de defensa frente a una amplia variedad de agresiones externas tales como agentes químicos, microorganismos, deshidratación, traumas mecánicos y radiación ultravioleta, desencadenando la activación de diferentes mecanismos de protección. Asimismo, la piel ejerce otras funciones que permiten el correcto mantenimiento de la homeostasis cutánea y la función de percepción y transmisión sensitiva de estímulos.

2.1 Barrera física

Los daños mecánicos que pudieran afectar la integridad de la piel se ven contrarrestados debido a la específica organización de las proteínas y células de las diferentes capas de la piel. En este contexto, el tejido adiposo subcutáneo junto con la dermis absorbe impactos gracias al entramado de las fibras de colágeno y elastina. Por su parte, el estrato córneo de la epidermis realiza oposición a daños físicos y mecánicos debido a los corneodesmosomas y la estructura de los corneocitos resultante del proceso de queratinización (13).

2.2 Función inmunológica

2.2.1 Tejido linfoide asociado a la piel (SALT)

Es una unidad funcional que provee a la piel de un mecanismo de inmunovigilancia, estando implicado en los dos tipos de respuesta inmune existente: la inmunidad innata, que reacciona frente al patógeno de manera inespecífica y no crea una memoria inmunológica, y la inmunidad adaptativa, en la que el patógeno es reconocido de manera específica y se enfrenta a él creando una memoria ante posibles infecciones futuras. El SALT está compuesto por diferentes tipos celulares como queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, linfocitos T, macrófagos y mastocitos (14).

- **Queratinocitos:** Contribuyen en la respuesta inmunitaria de la piel sintetizando citoquinas y participando en la presentación de antígenos a células del sistema inmune, para lo cual expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y de clase II (MHC-II), lo que favorece el reclutamiento de dichas células hacia las zonas de la piel afectada (15). Los queratinocitos reconocen, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PPR), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son secuencias moleculares de los microorganismos muy relevantes para su supervivencia, colonización y/o invasión. Entre los PPRs destacan los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés "*Toll-like receptors*"), encargados de activar una respuesta predominante de células T productoras de interferón alpha (IFN- α) y beta (IFN- β) (16). Además, los queratinocitos pueden sintetizar péptidos antimicrobianos (AMP) que son moléculas pequeñas, catiónicas y anfipáticas que rompen la pared celular del patógeno causando una mayor producción de citoquinas proinflamatorias y el consecuente reclutamiento de células del sistema inmune. Los AMP pueden ser sintetizados y almacenados en los gránulos lamelares de manera constitutiva en los

queratinocitos de las capas más internas de la epidermis para posteriormente ser liberados, o sintetizarse en respuesta a una invasión de patógenos en los queratinocitos de las capas más externas de la epidermis (17).

- **Células de Langerhans:** Inicialmente, se activan por la presencia de patógenos incrementando la expresión de MHC-II en superficie. Acto seguido, comienzan a migrar desde el estrato espinoso a los nódulos linfáticos locales donde presentan antígenos a los linfocitos T. A partir de este momento, las células de Langerhans activadas alcanzan su madurez máxima incrementando la expresión de citoquinas y modulando la diferenciación de los linfocitos T y B (18).

- **Melanocitos:** Son capaces de activar la respuesta inmune innata y adaptativa en la piel. De hecho, estas células expresan en su superficie MHC-II, moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y TLR haciéndolas capaces de presentar antígenos y favorecer la liberación de citoquinas proinflamatorias con el objetivo de atraer a células del sistema inmune (19). Además, los melanocitos pueden eliminar los patógenos a través de un mecanismo de defensa local basado en la fagocitosis (20).

- **Linfocitos T:** Todos los linfocitos presentes en la piel expresan en su superficie el antígeno linfocitario cutáneo que les posibilita unirse a las E-selectinas del endotelio de los vasos sanguíneos para transportarse al estrato basal de la epidermis, próximas a las células de Langerhans o rodeando a capilares y anexos cutáneos de la dermis. La población de linfocitos T en la piel es heterogénea encontrándose los siguientes tipos: Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, Th25 y T reguladoras (Treg) que sintetizan diferentes tipos de citoquinas (21).

- **Macrófagos:** Se encuentran en la piel de manera constitutiva, pero aumentan su número cuando se produce una inflamación al ser atraídos por citoquinas proinflamatorias para participar tanto en la respuesta innata como adaptativa del sistema inmune. Por un lado, eliminan patógenos mediante fagocitosis formando vesículas llamadas fagolisosomas en cuyo interior actúan enzimas y especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por otro lado, actúan como células presentadoras de antígenos. (22).

- **Mastocitos:** Son células localizadas en la dermis y se caracterizan por expresar receptores IgE en su superficie y tener gránulos que contienen sustancias vasoactivas y proinflamatorias tales como serotonina, histamina, factor de activación plaquetaria y leucotrienos que son liberadas para hacer frente a infecciones y agentes nocivos (23).

2.2.2 Microbiota cutánea

La microbiota de la piel, cuya función es proteger al organismo de patógenos invasores, está constituida por bacterias (las más representativas son: *Corynebacteria* 22.8 %, *Propionibacteria* 23.0 % y *Staphylococci* 16.8 %), hongos y virus (24). La microbiota de la piel se establece durante la etapa postnatal, cuando el sistema inmune es inmaduro, permitiendo que se reconozcan a estos microorganismos como propios y evitando que el organismo reaccione frente a ellos posteriormente (25). Algunas bacterias de la microbiota de la piel como *Lactococcus*, *Streptomyces*, o *Streptococcus* producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de especies patógenas competidoras por los mismos recursos (26).

Las bacterias y hongos son más específicos de determinadas regiones según el pH, disponibilidad nutricional y humedad, mientras que los virus se distribuyen por todas las regiones sin tener una clara especificidad. Por ejemplo, las áreas secas son consideradas las de mayor diversidad, mientras que en regiones sebáceas abundan *Propionobacterium acnes* y *Malassezia restricta* y en las zonas húmedas especies de *Staphylococcus* y *Corynebacterium* (27).

2.3 Hidratación cutánea

El control de la captación de agua ambiental, la composición lipídica y la degradación de FLG en la epidermis son indispensables para una correcta hidratación cutánea, esencial para el mantenimiento fisiológico de la piel.

En primer lugar, el agua es fundamental para las reacciones enzimáticas de degradación de los corneodesmosomas durante el proceso de descamación. Por lo que, cuando hay deshidratación dichas uniones no se rompen, impidiendo la descamación natural de la piel, lo que da lugar a una piel de aspecto seco (28). En segundo lugar, los lípidos liberados por los gránulos de queratohialina están unidos covalentemente formando la principal barrera de impermeabilidad de la piel, evitando la pérdida de agua (29). En tercer lugar, la proteólisis de FLG por proteasas en el estrato córneo tiene como resultado la liberación de factores de hidratación natural (NMF). Los NMF son una mezcla de moléculas higroscópicas de aminoácidos libres, ácido urocánico y ácido pirrolidona carboxílico que aportan humedad y flexibilidad a la piel (Fig. 2). Su regulación dependerá de la humedad relativa del ambiente, puesto que cuando es alta se producirán menos NMF que en situaciones de escasez de agua (30).

2.4 Protección frente a radiación ultravioleta

La exposición a luz ultravioleta (UV) puede producir inflamación, modificaciones en el ADN, hiperqueratinización y producción de ROS provocando la senescencia y muerte celular prematura por activación de metaloproteinasas (31).

Los melanocitos sintetizan un pigmento fotoprotector denominado melanina, capaz de absorber entre el 50-75 % de los fotones de la radiación UV y de interaccionar y eliminar los radicales libres como el radical hidroxilo, superóxido u oxígeno singlete (32). Concretamente, la melanina es sintetizada en los melanosomas, que son unos gránulos presentes en los melanocitos del estrato basal de la epidermis. Durante su maduración, el melanosoma se desplaza por el citoplasma hacia la membrana celular del melanocito y es transferido a través de filopodios a los queratinocitos adyacentes cuando la síntesis de la melanina es completada (melanogénesis) (33).

La enzima tirosinasa tiene un papel clave en la melanogénesis, ya que cataliza la hidroxilación de L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y su posterior oxidación a DOPA-quinona. A partir de la DOPA-quinona se sintetizan dos tipos de melanina cuya combinación determina el color de la piel: la eumelanina y la feomelanina. La primera se produce en ausencia de cisteínas o glutatión, de manera que la DOPA-quinona es transformada a DOPA-cromo, la cual termina transformándose en eumelanina. Mientras que, la transformación de la DOPA-quinona en 5-S-cisteinilDOPA o 5-S-glutationilDOPA por la presencia de cisteínas o glutatión respectivamente y su posterior oxidación producirá feomelanina (34). Cabe destacar, que la cantidad de feomelanina se mantiene constante entre personas con diferente pigmentación de piel, mientras que la eumelanina tiene alta capacidad fotoprotectora apareciendo en mayor cantidad en pieles más oscuras (35).

Otro mecanismo de protección que se activa en la piel por la radiación UV es la autofagia, proceso a través del cual se eliminan componentes celulares dañados permitiendo el reciclaje del contenido citoplasmático para facilitar la supervivencia celular. Para ello, se encapsula los componentes a eliminar en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que se unen a lisosomas formando autolisosomas en cuyo interior ácido hay enzimas hidrolíticas que provocan la degradación de su contenido (36). Por un lado, en los melanocitos se activa la autofagia eliminando ROS acumuladas por la excesiva radiación solar para evitar la senescencia prematura de la célula y también está involucrada en la maduración del melanosoma y su degradación

cuando estos están dañados (37). Por otro lado, la autofagia en los queratinocitos también interviene en la coloración de la piel de manera independiente de la melanogénesis, ya que degrada los melanosomas que se encuentran en el queratinocito para evitar su acumulación. Como consecuencia de este proceso se previene de un exceso de pigmentación (38).

2.5 Función sensorial

La piel es responsable de la percepción de los estímulos, bien mediante estructuras específicas denominadas receptores cutáneos, o bien a través de receptores de membrana de las propias células localizadas en la piel. El objetivo de ambas estructuras es transformar la información captada en estímulos nerviosos y transferirla hacia el sistema nervioso central.

2.5.1 Receptores cutáneos

La distribución y densidad de los receptores cutáneos sensoriales es variable siendo las más abundantes en las yemas de los dedos, labios y genitales mientras que son más escasos en el dorso y extremidades (39). Los receptores cutáneos envían la información de sus respectivos estímulos mediante fibras nerviosas de las neuronas sensoriales localizadas en el asta dorsal de la médula espinal a través de cambios en los potenciales de acción. Según el estímulo que perciben, los receptores cutáneos se clasifican en (Fig. 3):

- **Mecanorreceptores:** Son activados por estímulos inocuos para la piel como la alteración de esta por contacto. Según su estructura se clasifican en terminaciones nerviosas libres que llegan hasta la epidermis y detectan el estiramiento (40); los corpúsculos de Ruffini, localizados en la dermis y con forma de huso que detectan el estiramiento, presión y distorsión de la piel (41); los corpúsculos de Pacini, situados en la dermis y formados por capas celulares laminares que les dota de una forma ovalada siendo capaces de percibir presiones profundas y vibraciones de alta frecuencia (42); los corpúsculos de Meissner, se encuentran en la dermis superior cerca de la epidermis y tienen forma elipsoide por el apilamiento de células lamelares e intervienen en la detección de cambios en la presión y la vibración de baja frecuencia (41); y los discos de Merkel localizados en la epidermis formados por terminaciones nerviosas y células de Merkel, están involucrados en el tacto de baja frecuencia (43).

- **Nociceptores:** Son terminaciones nerviosas libres capaces de transducir estímulos potencialmente dañinos que generan dolor. Cuando se produce la sensibilización de los nociceptores, causado por un daño previo de la región, estos se quedan activados provocando dos situaciones: la primera es que un estímulo que en condiciones normales no debería causar efecto sobre los nociceptores en esta situación sí provoque dolor, a este fenómeno se le conoce con el nombre de alodinia; la segunda es que se produzca hiperalgesia, que consiste en una disminución del umbral del dolor, de tal modo que un estímulo que en condiciones fisiológicas no es nociceptivo provoque una activación anticipada de los mismos (44).

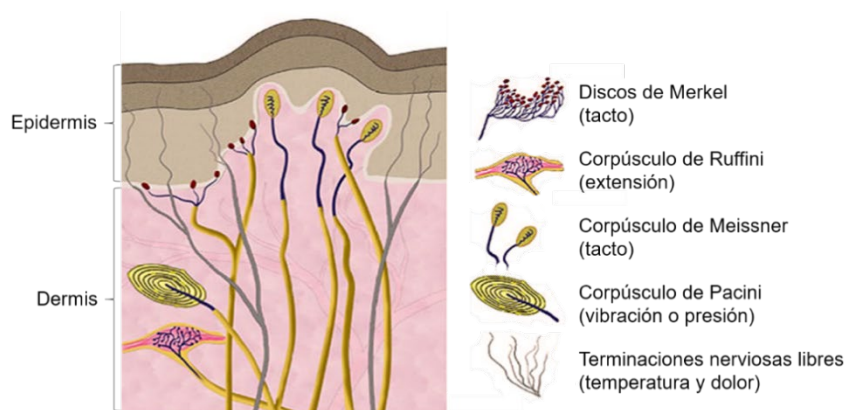


Figura 3. Distribución de los mecanorreceptores en la piel. Modificado de Abaira y cols. The sensory neurons of touch. *Neurons* 2013.

- **Quimiorreceptores:** Detectan compuestos químicos que ocasionan dolor bien sea por activación de los nociceptores o por neurotransmisores que aumentan la capacidad de otros estímulos a provocar dolor (39).

- **Termorreceptores:** Terminaciones nerviosas libres que llegan a la epidermis y son activadas cuando la temperatura es inferior a 30 °C o superior a 43 °C (45).

2.5.2 Receptores celulares con función sensorial: receptores de potencial transitorio

Las terminaciones nerviosas libres referentes a nocicepción contactan con células presentes en la piel como queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células inmunes y sebocitos, todas ellas presentan en su membrana celular los denominados receptores o canales de potencial transitorio (TRP) (46).

Los receptores TRP están constituidos por seis fragmentos transmembrana (S1 a S6) y un bucle hidrofílico que forma un poro por el que permean cationes. Los dominios intracelulares amino y carboxilo terminal son las regiones más variables de estos

canales existiendo diferentes familias según su secuencia primaria de aminoácidos: TRPC (canónica), TRPV (vanilloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) y TRPML (mucolipina) (47). Estos canales son activados por estímulos físicos, químicos y termales actuando como sensores celulares y provocando cambios en el potencial de membrana, el flujo de iones y la actividad enzimática (48).

En condiciones fisiológicas, los canales TRP están involucrados en la formación y mantenimiento de la barrera de la piel, crecimiento celular, diferenciación celular, inmunidad cutánea y procesos inflamatorios. Ante estímulos nocivos se va a encargar del procesamiento del dolor, picor y sensaciones térmicas, permitiendo al organismo detectarlos y actuar frente a ellos (49). Igualmente, la activación de receptores da lugar a la secreción de neuropéptidos siendo los más estudiados la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la adrenomedulina, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa, el neuropéptido Y o la bradiquinina. Tienen un papel relevante en la homeostasis del tejido epitelial y la remodelación del tejido cutáneo participando en situaciones fisiológicas o patológicas como es la inflamación neurogénica (50).

2.6 Otras funciones dependientes de receptores celulares implicadas en la homeostasis de la piel

Además de las funciones descritas anteriormente que promueven el mantenimiento de la homeostasis de la piel, en esta también participan otros componentes entre los que destacan el sistema endocannabinoide (SEC) y los receptores activados por proliferadores del peroxisoma (PPAR).

2.6.1 Sistema endocannabinoide

El SEC participa y regula numerosos procesos fisiológicos del organismo y engloba a los receptores de cannabinoides acoplados a proteína G, a los cannabinoides sintetizados de manera endógena denominados endocannabinoides y a las enzimas que sintetizan, transportan y degradan los endocannabinoides. Aunque las funciones mejor estudiadas sobre el SEC están relacionadas con el sistema nervioso central e inmune, en las últimas dos décadas se ha demostrado su importancia en el mantenimiento de la homeostasis de la piel, la formación de barrera epidérmica y la regeneración. Por lo que su desregulación se relaciona con varias enfermedades y trastornos de la piel altamente prevalentes (51).

Tanto los receptores de cannabinoides de tipo 1 (CB₁) como los de tipo 2 (CB₂), se expresan en melanocitos, fibroblastos, células de glándulas sudoríparas y fibras nerviosas de la dermis. De forma específica, CB₁ se expresa en los queratinocitos del estrato espinoso y granuloso, células sebáceas diferenciadas y células epiteliales del folículo piloso, mientras que CB₂ se expresa en los queratinocitos del estrato basal, células sebáceas indiferenciadas y del folículo del piloso (52, 53).

Los endocannabinoides como la anandamida y el 2-araquidonilglicerol son sintetizados por las enzimas fosfolipasa D y diacilglicerol lipasa, respectivamente, mientras que su degradación es llevada a cabo fundamentalmente por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la mocoacilglicerol lipasa (MAGL), ambos procesos se llevan a cabo en queratinocitos, melanocitos y fibroblastos (53). Los endocannabinoides son capaces de unirse también a otros receptores como TRPV-1 (un tipo de canal TRPV) o PPAR, demostrando que el SEC está íntimamente relacionado con otros receptores o sistemas del organismo para desarrollar sus funciones adecuadamente (51).

La participación del SEC en la proliferación y diferenciación de queratinocitos es relevante, de hecho la activación de CB₁ por sus agonistas a bajas dosis previene su diferenciación excesiva y regula la expresión de marcadores de la diferenciación (54); en cambio, a dosis altas inhibe la proliferación induciendo la apoptosis de queratinocitos (55). Los agonistas de los receptores CB₁ aceleran la recuperación de la barrera epidérmica y la regulación de la expresión de las queratinas parece estar modulada a través de la respuesta a cannabinoides (56, 57). Por otro lado, la expresión de CB₁ y CB₂ modula el proceso de cicatrización a través de agonistas de CB₂ que atenúan la fibrogénesis y migración de los queratinocitos (51).

El SEC en la piel regula la inflamación ya que agonistas de CB₁ y CB₂ disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias (58). En los melanocitos bajas concentraciones de agonistas de CB₁ estimulan la melanogénesis y la actividad tirosinasa constitutiva y, por el contrario, son capaces de inhibir la melanogénesis inducida por radiación UV (59). Los agonistas de CB₂ aumentan la secreción de sebo por parte de las glándulas sebáceas pudiendo ser regulado a través de ligandos moduladores de CB₂ (60). También se ha observado que la ausencia de la sensibilidad de estos receptores contribuye al picor, haciendo que antagonistas o agonistas inversos de CB₁ tengan actividad anti-pruritogénica a nivel periférico (61).

2.6.2 Receptores activados por proliferadores del peroxisoma

Los receptores PPAR pertenecen a la familia de los receptores hormonales nucleares y se expresan en queratinocitos, adipocitos o células del sistema inmune. Estos receptores son activados por ácidos grasos, metabolitos de ácidos grasos e isoprenoides, por lo que se consideran “liposensores” (62). Como se muestra en la figura 4, cuando un agonista se une a PPAR, este heterodimeriza con el receptor X retinoide y forma un complejo que se transloca al núcleo y se une a regiones del ADN denominadas elementos de respuesta a proliferadores de peroxisoma (PPRE), conllevando la inducción de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y glúcidos y de la diferenciación (63). Además, estudios recientes han demostrado que los PPAR regulan funciones celulares importantes en la piel, como inflamación, respuesta inmune, proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis (63). Hay tres isotipos y todos ellos se expresan en la piel: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ .

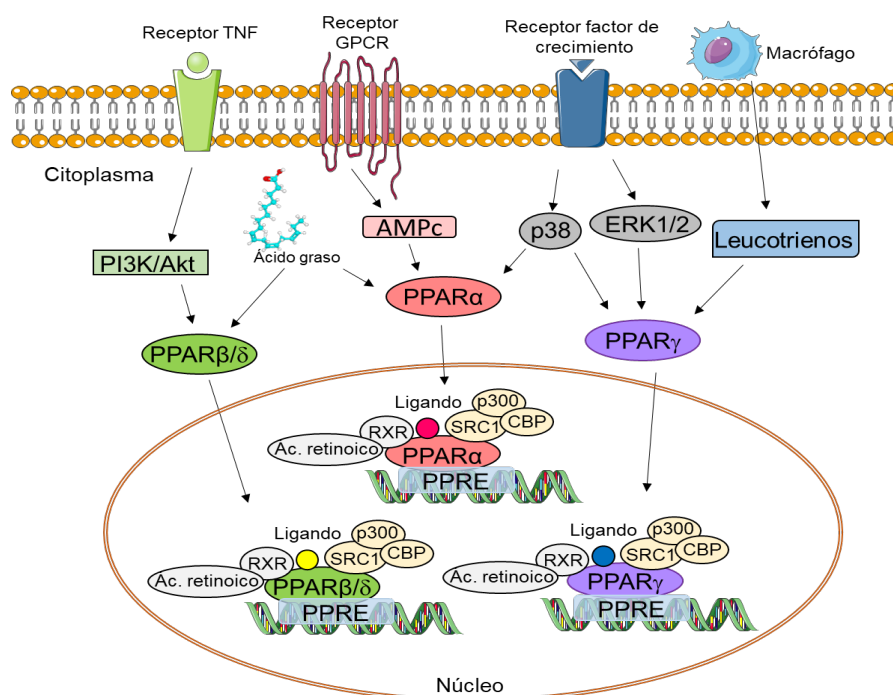


Figura 4. Vía molecular de los receptores PPAR

- **PPAR α :** Está implicado en el desarrollo cutáneo fetal, la maduración de la barrera epidérmica y la actividad de los sebocitos (64).
- **PPAR β/δ :** Regula la diferenciación de los sebocitos, promueve el crecimiento del folículo piloso y posee efectos pro-diferenciadores en queratinocitos (65).
- **PPAR γ :** Participa en la diferenciación de las glándulas sebáceas y queratinocitos (64).

3. Principales procesos biológicos inducidos en las patologías de la piel

Ante factores externos y/o internos adversos, la homeostasis de la piel puede verse alterada, desregulándose rutas de señalización celular que pueden desencadenar la aparición de patologías. Aunque hay una gran cantidad de enfermedades en la piel, muchos de los procesos biológicos alterados tienen características comunes. Entre ellos destacan la inflamación, el estrés oxidativo y la disrupción de la barrera cutánea.

3.1 Inflamación

La inflamación de la piel ocurre en una gran diversidad de afecciones dermatológicas caracterizándose por la presencia de eritema, vasodilatación, activación de mastocitos e infiltración de células inmunes como neutrófilos y macrófagos a la región afectada. La penetración de agentes patógenos o citoquinas que se unen a receptores de membrana desencadenan vías de señalización que median en la inflamación, entre ellas se encuentran: el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- κ B), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de transducción de señal de la quinasa Janus (JAK) con el traductor de señal y activador de la transcripción (STAT). En condiciones fisiológicas estas rutas están estrictamente reguladas, no obstante, pueden activarse constitutivamente en condiciones patológicas (66) (Fig. 5).

- **NF- κ B:** Está presente en casi todas las células del organismo regulando la expresión de genes cuyas proteínas participan en procesos como la respuesta inmune, la inflamación, desarrollo, proliferación y supervivencia celular. Este factor de transcripción se engloba en la familia constituida por 5 miembros denominados p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 y NF- κ B2, los cuales pueden formar homo o heterodímeros combinándose entre ellos. La activación de NF- κ B se da a través de la unión de citoquinas proinflamatorias a sus respectivos receptores que activan el complejo I κ B quinasa (IKK), constituido por dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y al menos una subunidad reguladora (IKK γ). El complejo IKK activado fosforila a I κ B que tras su ubiquitinación se degrada por el proteosoma permitiendo que los homo o heterodímeros de NF- κ B sean liberados y se transloquen al núcleo. (67). La desregulación de NF- κ B causa consecuencias perjudiciales al provocar inflamación aguda. De hecho, la regulación de NF- κ B frente a múltiples factores inductores de estrés, desempeña un papel importante en la fisiología epidérmica. En la piel, NF- κ B

induce la producción de citoquinas y quimioquinas en queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, entre otras, lo que conlleva al reclutamiento de células T en la piel. El equilibrio entre las células inmunes y epiteliales es crítico para evitar la inflamación crónica y mantener un correcto funcionamiento del sistema inmunitario (68).

- **MAPK:** Es una ruta de señalización en la que una cascada de quinasas son activadas por citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento o estrés genotóxico, osmótico, hipóxico u oxidativo. MAPK transmite la señal desde el receptor tirosina quinasa hasta la quinasa reguladora por señal extracelular (ERK), p38 o la quinasa c-Jun NH₂ terminal (JNK) que serán activadas translocándose y activando factores de transcripción (69). Se ha documentado que la radiación UV activa la quinasa p38 en células epidérmicas induciendo inflamación local en el área expuesta, además la activación de p38 y ERK en queratinocitos se refleja en un aumento de la producción de péptidos antimicrobianos (69, 70). Además, la hiperactivación de las MAPK favorece la disminución de los niveles de calcio intracelular y la expresión de FLG e involucrina a través de p38 y ERK en queratinocito causando defectos en la integridad de la barrera epidérmica (71).

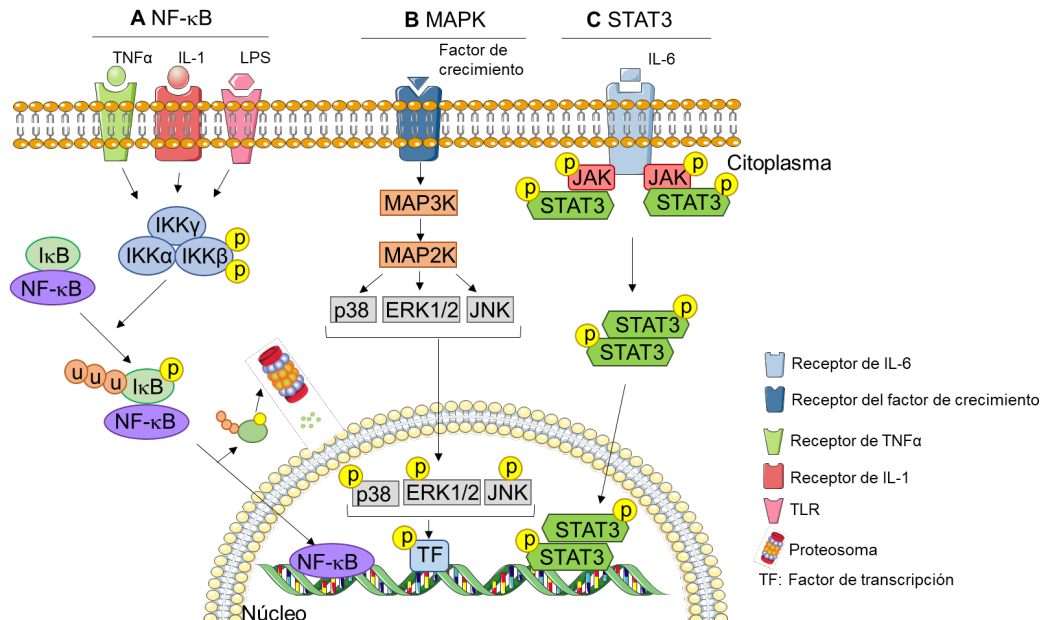


Figura 5. Rutas moleculares involucradas en inflamación. A. Vía de activación de NF-κB. **B.** Activación de MAPK. **C.** Vía STAT3.

- **STAT3:** Es un factor de transcripción que pertenece a la familia STAT que incluye 7 miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) (72). En condiciones fisiológicas STAT3 se encuentra estrictamente regulado y se activa

de forma transitoria por la unión de citoquinas o factores de crecimiento a sus receptores, provocando la dimerización y autofosforilación de residuos de tirosina de JAK (JAK1 y JAK2) y Src, haciendo que se unan las moléculas inactivas de STAT3. A su vez, la unión JAK-STAT3 produce la fosforilación de STAT3 formando dímeros que se translocan al núcleo donde se une a elementos de respuesta del ADN regulando la transcripción de sus genes dianas (73). La inflamación producida por la activación de STAT3 participa en la migración de los queratinocitos, cicatrización de heridas en la piel, crecimiento del folículo piloso y resistencia a la apoptosis inducida por la radiación UV (74).

3.2 Estrés oxidativo

El oxígeno es una molécula esencial en la respiración celular, mediante la cual se obtiene energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Como resultado de este proceso se forma ROS que son eliminadas mediante sistemas de antioxidantes celulares altamente regulados. En ocasiones este equilibrio puede alterarse llevando a la célula a un estado de estrés oxidativo que induce toxicidad. Por tanto, el estrés oxidativo puede ser causado por una generación anormal de ROS o por deficiencias en los sistemas antioxidantes (75). Los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo pueden ser enzimáticos mediante la catalasa, quinona oxidoreductasa (NQO1) y glutatión peroxidasa, entre otras enzimas, o no enzimáticos como es el caso de vitamina C o el α -tocoferol, entre otros (76). La inducción de estas enzimas es mediada por el factor de transcripción nuclear eritroide 2 (NRF2). Fisiológicamente, NRF2 está presente en concentraciones bajas y está muy regulado ya sea a nivel transcripcional o post-transcripcional (Fig. 6) (77). Keap1 es el regulador negativo más importante de Nrf2 ubiquitinándolo y degradándolo por el proteosoma. El aumento de ROS provoca la separación de Nrf2 de Keap1 permitiendo la estabilización y translocación de Nrf2 al núcleo. Keap1 a su vez es regulado por p62/SQSTM1: la fosforilación de p62/SQSTM1 provoca la disrupción entre Keap1 y Nrf2, el cual entra en el núcleo. Nrf2 en el núcleo se junta con proteínas de la familia Maf formando heterodímeros que se unen a elementos de respuesta a Maf (MARE) que incluyen a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) localizados en los promotores de genes dianas de NRF2 antioxidantes y citoprotectores, promoviendo la transcripción de catalasa, NAD (P) H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1), glutamato-cisteína ligasa

(GCLC), tioredoxina reductasa (TXNRD1), sequestosoma 1 (SQSTM1/p62) y hemo oxigenasa-1 (HMOX1) (Fig. 8) (78-81).

El estrés oxidativo tiene efectos sobre la activación de factores de transcripción como AP-1, p53 y NF- κ B, activación de la familia MAPK, apertura de canales que conlleva la pérdida de calcio intracelular, peroxidación lipídica, modificación de proteínas y oxidación del ADN (82-84). Por consiguiente, una desregulación redox afecta, entre otros, a la función de barrera cutánea o a la pigmentación (85). En cambio, la activación de Nrf2 promueve la reparación de heridas a través de la modulación de la inflamación, apoptosis y estrés oxidativo. Además, estudios recientes sugieren un papel protector de la activación de Nrf2 y su expresión génica en la supresión del daño cutáneo inducido por la radiación UV (85, 86).

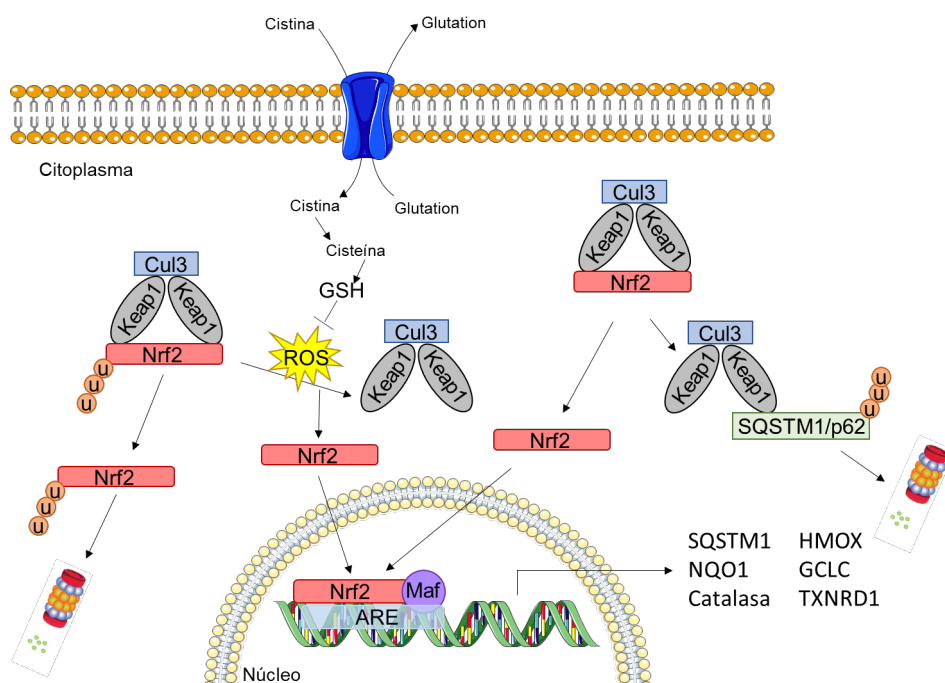


Figura 6. Ruta molecular de Nrf2 y su regulación.

3.3 Disrupción de la barrera cutánea

Cuando la barrera epidérmica sufre un daño se hace susceptible a la entrada de agentes patógenos. Ante esta situación, se desarrolla un mecanismo de reparación que consta de varias fases: una primera etapa inflamatoria, seguida de una etapa de reparación en la que se sustituyen las estructuras especializadas y, en último lugar, se da un proceso de regeneración mediante el cual las proteínas de la matriz extracelular promueven la adhesión celular, la migración y la proliferación (87).

Existen múltiples factores que pueden provocar un empeoramiento de la cicatrización. Hay factores locales como el grado de oxigenación, la infección, agentes externos, insuficiencia venosa; o factores sistémicos como la edad y el género, hormonas sexuales, estrés, algunos medicamentos, isquemia, nutrición o enfermedades como la obesidad, la inmunosupresión, diabetes, etc. (88). En algunos casos, la disrupción de la barrera epidérmica conlleva la ruptura de los vasos sanguíneos provocando una deficiencia de la aportación de oxígeno en la región afectada creándose un ambiente hipóxico. En este contexto, cabe destacar el papel del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) ya que favorece la angiogénesis y la actividad antimicrobiana al promover el incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias (89). HIF-1 es un dímero formado por HIF-1 α , regulado por los niveles de oxígeno, y HIF-1 β , que se expresa constitutivamente. La regulación de HIF-1 ocurre por la rápida degradación post-traducciona l o la estabilización de la subunidad HIF-1 α , debe ser muy controlada, ya que su deficiencia puede generar heridas crónicas, mientras que un exceso del mismo contribuye a fibrosis y cicatrización excesiva (90, 91).

4. Principales patologías de la piel

Las enfermedades de la piel se encuentran entre las afecciones de salud más comunes, afectando en torno a 900 millones de personas a nivel mundial según la OMS. En concordancia con lo anterior, los estudios de la carga global de las enfermedades “*Global Burden of disease Project*” realizados desde el año 1990 a 2016, indican que las enfermedades de la piel y tejido subcutáneo ocupan la cuarta posición de enfermedades no letales a nivel mundial (92). Entre ellas, destacan la dermatitis, acné vulgaris, psoriasis y enfermedades virales y fúngicas (93). A pesar de la baja mortalidad, tienen elevadas consecuencias socioeconómicas y una disminución de la calidad de vida de los pacientes.

4.1 Dermatitis atópica

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad crónica inflamatoria de la piel con una prevalencia del 20 % en niños y un 10 % en adultos en países desarrollados (94). Esta enfermedad es causada por una reacción cutánea exacerbada a factores ambientales. La DA cursa con síntomas en brotes de lesiones eritomatosas con exudación, ampollas y costras en las primeras etapas, mientras que posteriormente se forman escamas, fisuras y engrosamiento acompañado de un intenso picor e

incomodidad. Esto repercute en una disminución de la calidad de vida de la persona, ya que conduce a la pérdida de sueño, disminución de la autoestima y bajo rendimiento (95). Estas lesiones aparecen en las partes internas de los codos y rodillas y la cara, aunque en ocasiones puede llegar a cubrir el 90 % de la superficie del cuerpo (96).

La aproximación terapéutica para la DA va a depender fundamentalmente de la gravedad de la enfermedad, existiendo unos criterios según los cuales se asigna un valor que permite clasificar el grado en el que se encuentra (97). Según la severidad de la DA se aplicarán diferentes tratamientos como se muestra en la figura 7 (98, 99). Cabe destacar, que en los grados leves o moderados el objetivo es tratar el prurito, suprimir la inflamación y restaurar la función de barrera cutánea, para lo cual se suele utilizar tratamientos tópicos como emolientes activos (100, 101)

A

Severo: Puntuación > 50 o síntomas persistentes	Hospitalización, inmunosupresión sistémica, ciclosporina A, glucocorticosteroides orales, dupilumab, metotrexato, azatioprina, micofenolato de mofetilo, antihistaminicos orales y fototerapia (UVA)
Moderado: Puntuación 25-50 o recurrente	Tratamiento tópico de tacrolimus o glucocorticosteroides clase II o III, terapia de envoltura húmeda, fototerapia (UVB)
Medio: Puntuación < 25 o transitoria	Tratamiento tópico de glucocorticosteroides clase II, inhibidores de calcineurina, antisépticos
Basal: Piel seca	Emolientes, baños de aceite, evitar exposición a alérgenos

B

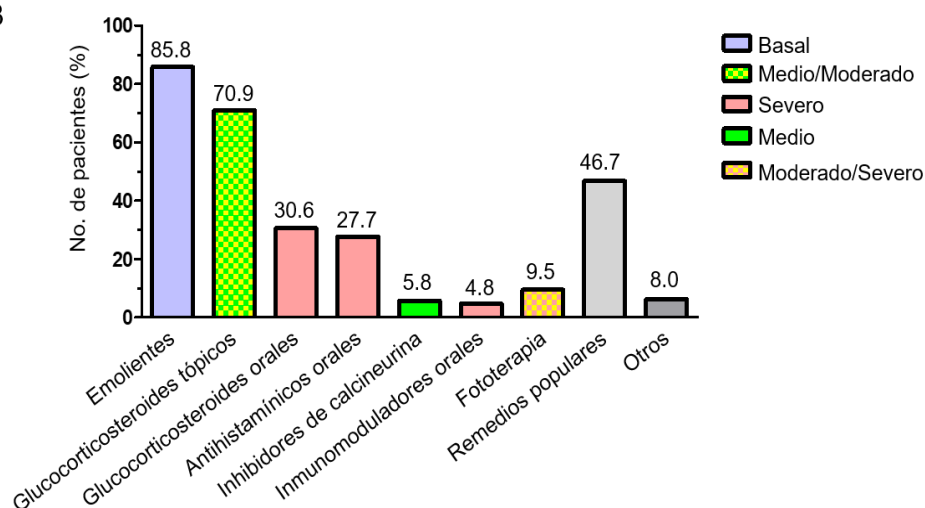


Figura 7. Tratamiento recomendado para DA. A. Tratamientos según la severidad de la enfermedad. Modificado de Wollenberg J. y cols. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2018. B. Porcentaje de pacientes que han utilizado cada tratamiento. Modificado de Chu H. y cols. Clinical Diversity of Atopic Dermatitis: A Review of 5,000 Patients at a Single Institute *Allergy Asthma Immunol Res*, 2017.

La patogénesis en la DA es compleja ya que combina la disfunción de la barrera cutánea con alteraciones inmunológicas y otras alteraciones moleculares, pudiéndose complicar con infecciones microbianas.

- **Disfunción de la barrera cutánea:** Las causas de dicha disfunción son heterogéneas, implicando alteraciones genéticas y de expresión de proteínas. Muchas mutaciones genéticas han sido relacionadas con la DA, sin embargo, destacan las mutaciones en el gen de FLG como responsables de la enfermedad, siendo las más predominantes la mutación R501X y la 2282del4 que conllevan a la pérdida total de la expresión de dicha proteína (102). La expresión de FLG también puede verse reducida por una sobreexpresión de citoquinas producidas por las células T que regulan negativamente la producción de la misma, lo que justificaría la inflamación como una primera fase del desarrollo de la DA (103). La disminución de FLG conlleva una reducción de la producción de NMF provocando cambios en el microbioma y una disminución de metabolitos en el estrato córneo que implica variaciones del pH ocasionando una degradación de los corneodesmosomas y, por tanto, la entrada de *Staphylococcus aureus* que causa un incremento exacerbado de IgE (104-106). Otra posible causa de fallo de la barrera en DA son alteraciones de la expresión de proteínas causadas por cambios en el gradiente de calcio, que regula la proliferación y diferenciación, o cambios en el pH como por ejemplo las proteasas serinas KLK5 o KLK7, las cuales están involucradas en la descamación siendo muy sensibles a estos cambios, ya que se ve incrementada su actividad si el pH aumenta (107, 108).

- **Alteraciones inmunológicas:** Muchos estudios han enfatizado en la responsabilidad de las citoquinas producidas por las células Th2 como IL-4 e IL-13 sobre la DA, aunque también están involucradas las células Th17 y Th22 que producen un incremento de IL-17, IL-22, IL-31 e IL-33. Muchas de estas interleuquinas se regulan a través de NF- κ B y, estas a su vez lo vuelven a inducir generando una inflamación crónica (109). Los niveles de IgE en suero se han visto incrementados en un 80-85 % en pacientes con DA, la justificación de este hecho pasa por dos causas: la primera es que al haber una disrupción de la barrera cutánea entran alérgenos a través de la piel a través de la piel que pueden provocar la activación de receptores FcR ϵ en mastocitos desencadenando una reacción alérgica; y la segunda, se debe a la interacción de la IgE sobre receptores FcR ϵ de células de Langerhans y macrófagos infiltrados en la piel lesionada, provocando la liberación de IL-1, TNF- α y factor activador plaquetario que son potentes desencadenantes de la inflamación (110).

- **Otras alteraciones moleculares:** El estrés oxidativo es otro factor patogénico de la DA y se debe al contacto de la piel con agentes irritantes, la activación de monocitos por la infección de *S. aureus* y la propia infiltración de células del sistema inmune en la zona afectada (111). A esto se suma una disminución de la capacidad antioxidante por una mayor peroxidación lipídica y una disminución de las vitaminas antioxidante A, C y E (112).

En la DA se observa una disminución de la expresión de PPAR α y un incremento de PPAR γ en queratinocitos y células inmunes (113). En este sentido, se ha demostrado que la deficiencia de PPAR α favorece la inflamación producida por NF- κ B, ya que no es capaz de inhibirlo, ocasionando problemas de queratinización (114).

Dado que el prurito es uno de los síntomas que desencadena mayores molestias en las personas con DA, este se ha relacionado con la sobreexpresión de TRPV-1 en las áreas afectadas (115). TRPV-1 es un subtipo de los canales TRP vanilloide que se activa por calor, pH bajo, capsaicina y mediadores inflamatorios endógenos (46). El picor histaminérgico de la DA se debe a un aumento de IgE en las regiones afectadas que induce la producción de histamina cuyo receptor está relacionado con la activación de TRPV-1 a través de la fosfolipasa A2 (116). En este sentido, hay estudios que demuestran que un bloqueo de estos canales reducen el picor y favorecen la recuperación de los daños en la barrera epidérmica (117).

4.2 Acné

El acné es una patología inflamatoria crónica de la piel en la que están involucrados los folículos y tallos pilosos, así como las glándulas sebáceas (118). El acné tiene una prevalencia que oscila en torno al 95 % en adolescentes mientras que en adultos es sensiblemente menor. Su mayor repercusión es la aparición de problemas psicológicos y sociales en la vida de las personas que lo padecen (119).

La fisiopatología del acné se caracteriza por hiperseborrea, queratinización anormal, infección cutánea, inflamación y disfunción de la inmunidad. El conjunto de estos procesos provoca la formación del comedón, que es la lesión producida por la obstrucción del poro o folículo piloso de la piel, donde no se dará la descamación natural de las células muertas provocándose una hiperqueratinización que aumenta el grosor del estrato córneo de la epidermis ((120 54).

El sebo es sintetizado en las glándulas sebáceas y está compuesto por una mezcla de lípidos no polares, entre los que destaca el escualeno (constituye el 15 % del contenido del sebo) (121). Hay una relación directa entre los niveles de sebo y la aparición de brotes de acné, siendo más pronunciada en hombres. Además, hay una relación entre la composición del sebo y las personas que presentan acné en comparación con aquellas que no lo presentan (122). Asimismo, el desequilibrio de la relación entre oxidantes/antioxidantes de los lípidos de la superficie de la piel está íntimamente relacionado con esta patología (123). Cabe destacar, que en la superficie de la piel el oxígeno y los microorganismos causan la lipólisis de triglicéridos en ácidos grasos y la formación de peróxidos lipídicos los cuales favorecen la formación del comedón y por tanto un aumento del estrés oxidativo y la inflamación (124).

Todos estos procesos que se producen en el área afectada promueven la entrada de bacterias como *Propionibacterium acnes*, un organismo que forma parte de la microbiota de la piel y que predomina en la región facial (24). En pacientes con acné, *P. acnes* provoca un aumento de la producción de IL-1 α a través de NF- κ B, TNF- α y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos en los queratinocitos, atrayendo a células inmunes alrededor de los comedones y activándose los TLR que favorecen la síntesis de péptidos antimicrobianos a través de inducción de HIF-1 α (125, 126). Adicionalmente, *P. acnes* presenta una alta actividad de la enzima hialuronidasa que degrada el ácido hialurónico de la matriz extracelular, alterando la estructura y aumentando la deshidratación de la piel (127).

Existen diferentes fases en la formación de la lesión por acné: inicialmente, el folículo piloso se obtura formando un comedón de cabeza blanca por entrada de *P. acnés* y, posteriormente, la región en contacto con el exterior se oxida formando un comedón de cabeza negra. La presencia de *P. acnes* junto con la acumulación de ROS favorece el reclutamiento de células del sistema inmune causando una inflamación denominada pápula. Finalmente, se origina una respuesta inmune que incrementa la inflamación del folículo piloso formándose la pústula la cual se engrosa dando lugar al nódulo o quiste (Fig. 8).

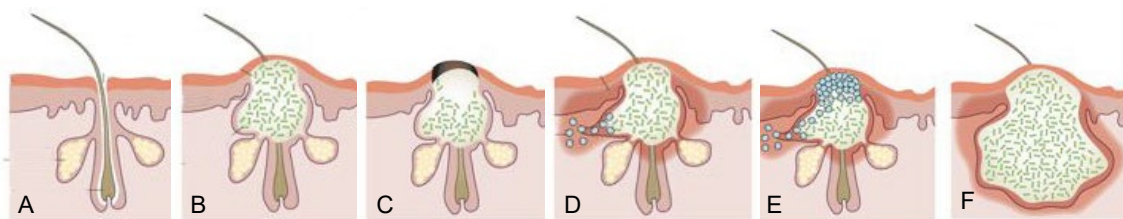


Figura 8. Fases de la lesión del acné. A. Folículo piloso normal. B. Comedón de cabeza blanca. C. Comedón de cabeza negra. D. Pápula. E. Pústula. F. Nódulo o quiste. Modificado de Tuchayi, S. y cols. *Acne vulgaris. Nat Rev Dis Primers*, 2015.

Para aplicar el tratamiento más adecuado frente al acné, se recurre a la Escala Integral de la Gravedad del Acné (CASS del inglés *Comprehensive Acne Severity Scale*) descrita en 2007 (Tabla 1) (128). En los casos más leves, se comienza con el tratamiento tópico de retinoides, ácido azelaico, ácido salicílico y/o peróxido de benzoilo mientras que en presencia de inflamación, se puede emplear agentes antiinflamatorios y antibióticos. Sin embargo, en acné moderado, severo o muy severo se recurre a tratamientos de uso sistémico basados en isotretinoína, antibióticos orales y/o agentes hormonales (129). Además, existe un extendido, refutado y amplio conocimiento acerca de medicina alternativa complementaria basada fundamentalmente en la aplicación tópica de extractos de plantas, aceites esenciales, vitaminas y minerales, entre otros (130). Los productos más utilizados en esta categoría para esta patología son vitamina C, aceite del árbol del té, niacinamida, extracto de té verde, resveratrol, ácido salicílico y alfa-hidroxiácidos (131). Aunque generalmente son usados en los grados más leves, también se emplean de manera complementaria en los casos más severos para paliar síntomas y reducir efectos secundarios (129).

Grado	Descripción
Muy severo	Acné altamente inflamado, con quistes por toda el área afectada
Severo	Toda el área con comedones, numerosas pústulas y pápulas y algunos quistes
Moderado	Bastante área afectada con numerosos comedones, pápulas y pústulas
Medio	Lesiones fácilmente detectables con comedones, pápulas y pústulas
Leve	Algunos comedones dispersos, pequeñas pápulas y muy pocas pústulas
Muy leve	Lesiones apenas perceptibles, muy pocos comedones y pápulas dispersas

Tabla 1. Grados de severidad del acné. Modificado de Oon, H. y cols. *Acne Management Guidelines by the Dermatological Society of Singapore. J Clin Aesthet Dermatol*, 2019.

4.3 Trastornos pigmentarios de la piel

Los trastornos pigmentarios son frecuentes y agrupan numerosas enfermedades de causas y pronósticos muy diferentes. Se originan por la variación cuantitativa o cualitativa de la melanina, por su distribución, o bien por el engrosamiento de la epidermis. Se clasifican según su afección en hiperpigmentación, hipopigmentación o coloraciones anómalas de la piel. A continuación, se describen dos ejemplos de trastorno hiperpigmentario.

- **Melasma:** Es una patología hiperpigmentaria adquirida que puede ser transitoria o permanente. Se conoce también como cloasma o “máscara del embarazo” ya que 25 % de los casos ocurre en embarazadas, dándose en un 15-50 % de ellas (132). Esta enfermedad presenta una etiología multifactorial apareciendo por una exposición excesiva a radiación UV, factores hormonales asociados al embarazo, consumo de anticonceptivos orales, predisposición genética y étnica y/o el uso de cosméticos (133).

Entre los factores hormonales destaca el incremento de los receptores de progesterona y estrógenos en las lesiones de melasma. Aunque no se ha logrado relacionar la progesterona con el aumento en la síntesis de melanina, los estrógenos sí están altamente relacionados con la melanogénesis. Concretamente, estos son activadores de la vía AMPc-PKA promoviendo la transcripción de genes, entre los que destaca el factor de transcripción asociado con microftalmia (MIFT) que regula la expresión de la enzima tirosinasa (134, 135).

El tratamiento del melasma fundamentalmente se basa en la aplicación de productos de uso tópico, aunque en los casos más graves es necesario recurrir a tratamientos sistémicos (136). El compuesto tópico más utilizado es la hidroquinona la cual se emplea sola o en combinación con tretinoína y/o corticosteroides. No obstante, debido a que la hidroquinona tiene importantes efectos secundarios, está en auge la búsqueda de productos naturales con efecto despigmentante como el ácido kójico, la vitamina C, soja, regaliz, arbutina, mequinol, niacinamida, glucosamina, aloesina, hesperidina, ácido azelaico, umbeliferona, semilla de uva, extracto de camomila y ácido tranexámico, entre otros (137). Los tratamientos sistémicos más frecuentes son la vitamina C, α -tocoferol, hidrocumarinas, ácido tióctico y ácido tranexámico. En ocasiones, también se recurre a terapias con láser y exfoliaciones químicas, aunque hay bastante controversia con respecto al uso de estas prácticas (136).

- **Lentigo:** Son máculas hiperpigmentadas cuyos hallazgos histológicos incluyen hiperplasia de la epidermis y aumento de la pigmentación de la capa basal como consecuencia de un aumento de la actividad de los melanocitos epidérmicos. Según su aparición y desarrollo se clasifican en: lentigo simple, consiste en máculas pigmentadas marrón oscuro-negra, bien delimitada y con menos de 1 cm de diámetro que suelen aparecer en la infancia, sin predisposición previa, en las zonas expuestas a la radiación UV como consecuencia de un incremento de la actividad tirosinasa (138); lentigo solar, caracterizado por máculas marrón oscuro, homogéneas e irregulares de hasta 1 cm de diámetro que se observan tras la exposición a las radiaciones UV en zonas expuestas como cara, cuero cabelludo, dorso de las manos, escote y parte superior de la espalda, estas son de carácter irreversible debido al daño que la radiación UV ejerce sobre el ADN (139); lentigo senil, se caracteriza por la aparición de manchas asociadas a la edad causadas por la acumulación de fibroblastos senescentes, los cuales alteran la diferenciación de los melanocitos por las interacciones estromales-epiteliales (140); y, finalmente, el lentigo maligno que constituye el 5 % de los melanomas y del cual no se observa una predisposición genética a su desarrollo (141).

Como tratamiento del lentigo, es muy frecuente el uso de terapias físicas como la fototerapia o la crioterapia, pero tiene elevados efectos secundarios (142). También, la aplicación de productos tópicos puede ser una buena opción para tratar en combinación con las terapias físicas o como terapia de mantenimiento del lentigo solar (143). Por esta razón, existe un gran desarrollo de ingredientes activos hipopigmentantes y antioxidantes para contrarrestar los efectos del lentigo solar y senil (144).

5. Ingredientes naturales

Las sustancias de origen natural suelen tener menos efectos secundarios que los productos sintéticos, el hallazgo de nuevos ingredientes naturales con propiedades antioxidantes, de inhibición de la pigmentación, antiinflamatorias y antimicrobianas los hace beneficiosos para la atenuación y prevención de diversas afecciones de la piel. En los últimos años, se ha originado un resurgimiento de la búsqueda y estudio de compuestos de origen natural como tratamiento para enfermedades de diversa índole. (145). Esto ha desarrollado la necesidad de nuevas regulaciones y conceptos para referirse a ellos, destacando los productos OTC (del inglés *over-the-counter*) o los cosmecéuticos cuyo uso está en auge.

La FDA (Agencia de medicamentos y alimentación de los Estados Unidos) define los OTC como “medicamentos seguros y efectivos para el uso del público en general sin buscar tratamiento por parte de un profesional de la salud” se caracterizan por su efectividad, sus escasos efectos secundarios, bajo coste y alta disponibilidad. Los OTC de uso tópico se clasifican según su acción en analgésicos, antibióticos, antimicóticos, antipruritogénicos, astringentes y otros. Basándose en datos obtenidos del *National Ambulatory Medical Care Survey* entre 1995-2000, se recoge que en un estudio realizado en Estados Unidos el 53.8 % de los OTC son recomendados por dermatólogos, siendo la primera línea de tratamiento para muchas condiciones dermatológicas (146). En el ámbito económico, algunos estudios han estimado que los OTC de uso tópico supusieron 2.6 mil millones de dólares en el mercado, alcanzando el 9 % del gasto total asociado a desórdenes dermatológicos (147).

En Europa se refiere con el término cosmecéuticos a los productos no farmacéuticos que tiene una acción terapéutica capaz de aliviar a la piel con un efecto duradero. Los cosmecéuticos tienen una gran relevancia en las afecciones dermatológicas, alcanzando entre el 30 al 40 % de los productos recomendados por dermatólogos (148). En la actualidad, este término no es reconocido por la FDA, por lo que en Estados Unidos estos productos se encuentran englobados dentro del término de OTC (149). Los cosmecéuticos se caracterizan por ser combinaciones basadas en ingredientes activos de origen natural los cuales deben someterse a una serie de análisis y pruebas que demuestren su seguridad para el uso en humanos (150).

5.1 Cannabidiol

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicotrópico aislado fundamentalmente de diferentes variedades de la planta *Cannabis sativa*. En Asia central y oriental surgió el cultivo de cannabis cuyo uso para diferentes dolencias fue muy popular, hasta que en el s. XX se consideró una droga. En la actualidad, aunque el uso médico del cannabis está siendo legalizado en algunos países, es el CBD extraído del cannabis el que está teniendo más auge e interés para un uso terapéutico (151).

Multitud de estudios han puesto de manifiesto las actividades farmacológicas del CBD, mostrando su acción antiinflamatoria, antioxidante, antiapoptótica, neuroprotectora, antiepiléptica, para la mejora de la hipoxia-isquemia en neonatos, como ansiolítico, antipsicótico, analgésico y antitumoral (152). Por ello, el CBD se ha

convertido en un tratamiento prometedor frente a numerosas patologías que van desde enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, trastornos autoinmunes como la esclerosis múltiple, artritis, esquizofrenia y cáncer (153-156). Cabe destacar, que en pacientes con DA, psoriasis, acné o infecciones cutáneas se ha observado una mejoría cuando se les aplicó tópicamente CBD, avalando su uso en patologías de la piel (157).

El CBD ejerce sus efectos a través de la interacción con diversos receptores, de hecho, se une con baja afinidad a los receptores CB₁ y CB₂, y actúa como agonista alostérico negativo de CB₁ (158). Por otra parte, el CBD se comporta como agonista para receptores acoplados a proteína G como GPR55 y GPR18 (ampliamente distribuidos) o GPR3, GPR6 y GPR12 (más específicos de cerebro y sistema reproductivo), receptor serotoninérgico y de TRPV-1 (159-162).

El incremento uso del CBD en investigación llevó a establecer los permisos por parte de la Unión Europea basados en el reglamento No 1223/2009, en el que se hace referencia a sustancias prohibidas para el uso tópico recogidas en la Convención Única sobre Estupefacientes (Nueva York, 1961), donde se expone que, el cannabis entendido como “las sumidades, floridas, con fruto de la planta del cannabis a excepción de las semillas y las hojas no unidas a las sumidades” estaba prohibido. Por tanto, se deduce desde la perspectiva de la legislación europea, que el CBD puede ser utilizado de manera tópica siempre que se obtenga de semillas y hojas que no estén acompañadas de las partes fructíferas de la planta.

5.2 Estrigolactonas

Las estrigolactonas (SL) son unas fitohormonas involucradas en la conformación estructural de los brotes y raíces y en las respuestas de la planta al estrés ambiental. Las SL se aislaron originalmente de los exudados de las raíces de las plantas de la familia *Orobanchaceae*, que incluyen los géneros *Striga*, *Orobanche*, *Phelipanche* y *Alectra* (163). El primer miembro de esta familia que se aisló fue el estrigol y, actualmente, hay más de 15 análogos estudiados. Todos estos análogos comparten la característica de tener lactonas terpenoides derivadas de los carotenos, es decir, 15 carbonos que se organizan en una estructura tricíclica unida a un anillo butanoico D por un enlace enol entre el oxígeno y el grupo metil (164).

Las SL sintéticas y naturales han sido ampliamente investigadas para su uso en agricultura, pero existen escasos estudios sobre sus efectos terapéuticos en el ser

humano. Entre ellos, destacan los resultados en los que se observó que favorecen la apoptosis e inhiben la reparación de ADN en células cancerígenas (165-168). Además, las SL también mejoran la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, atenúan la adipogénesis por inhibición de PPAR γ y controlan la inflamación por inhibición de la secreción de IL-6 en adipocitos (169, 170).

II. Objetivos

Los trastornos dermatológicos engloban a un amplio número de patologías cuya sintomatología es consecuencia de alteraciones en rutas moleculares. Actualmente, se está recurriendo a la aplicación de tratamientos basados en ingredientes naturales que se pueden usar en combinación con los medicamentos clásicos para mejorar los síntomas de la patología reduciendo los efectos secundarios. Debido a esto, hay un creciente interés en el estudio de los efectos biológicos de estos ingredientes sobre la piel.

En este contexto, los objetivos fundamentales que se abordan en esta tesis son los siguientes:

1. Creación y desarrollo de la plataforma SimDerma para el cribado de ingredientes naturales en rutas moleculares de interés dermatológico.
2. Identificación del mecanismo de acción del CBD sobre la ruta de señalización Bach1/Nrf2 y sus consecuencias funcionales en queratinocitos.
3. Desarrollo de combinaciones basadas en CBD y otros ingredientes bioactivos para el tratamiento de dermatitis atópica, acné y trastornos hiperpigmentarios.
4. Identificación de los efectos del estrigol y sus derivados en rutas moleculares afectadas en patologías de la piel.

III. Materiales y Métodos

1. Líneas celulares

Las mayoría de las líneas celulares fueron adquiridas en la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA), con excepción de las células HaCaT obtenidas de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), los queratinocitos epidérmicos humanos primarios (HEK) procedentes de Innoprot (Bizkaia, España), los melanocitos de ratón (B16) de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y las células estables 293T-CB2-CRE-Luc que fueron adquiridas de Kerafast (Boston, MA, USA). Todas las líneas celulares se cultivaron con sus medios de cultivo correspondientes a 37 °C, en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂, con controles rutinarios para asegurar que estuvieran libres de micoplasma y contaminación cruzada (Tabla 2).

Línea celular	Plásmido insertado	Descripción	Medio de cultivo
HEK	-	Queratinocitos epidérmicos humanos primarios	Basal de queratinocitos + 1% Factor de crecimiento + 1% Penicilina/Streptomicina
HaCaT	-	Queratinocitos humanos	RPMI 1640 + 10% FBS + 1% Penicilina/Streptomicina
HaCaT-ARE-Luc*	pARE-Luc		
HaCaT-EPO-Luc*	pEPO-Luc		
HaCaT-FLG-Luc*	pFLG-Luc		
HaCaT-KBF-Luc*	pKBF-Luc		
HaCaT-NucLight-Red*	pmKate2		
NIH3T3	-	Fibroblastos de ratón	DMEM + 10% FBS + 1% Penicilina/ Streptomicina
NIH3T3-COL1A2-Luc*	pCOL1A2-Luc		
NIH3T3-EPO-Luc*	pEPO-Luc		
NIH3T3-KBF-Luc*	pKBF-Luc		
NIH3T3-NucLight-Red*	pmKate2		
B16	-	Melanoma de ratón	
293T	-	Embrionaria de riñón humana	
293T-CB1-CRE-Luc*	pCB1+pCRE-Luc		
293T-CB2-CRE-Luc	pCB2+pCRE-Luc		
RAW264.7	-	Macrófagos de ratón	
RAW264.7-STAT3-Luc*	pSTAT3-Luc		

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en los ensayos experimentales. * corresponde a líneas celulares creadas de manera estable en el laboratorio.

A partir de algunas de ellas, se desarrollaron en el laboratorio líneas celulares estables. Para ello, se incorporó ADN plasmídico con la secuencia de interés y otro con la secuencia que permite la resistencia a un antibiótico, generalmente puromicina. A continuación, se sembró 2×10^5 células en placas de 6 pocillos con 5 ml del medio de cultivo correspondiente. Transcurridas 24 h, las células fueron transfectadas añadiendo una mezcla de 10 μ l de polietilenimina lineal (PEI) (Polysciences, Warrington, PA, USA) con 2 μ g del plásmido de interés y 0.2 μ g del plásmido que genera resistencia a puromicina en medio de cultivo sin antibiótico, incubándose durante 5 h. Después se aspiró el medio y se añadió medio de cultivo completo. Tras 48 h, se cambió el medio

por medio con 2 μ l/ml de puromicina (Merck KGaA). Esto provocó la selección de aquellas células que tuvieran inserto el plásmido de resistencia a puromicina que, al estar en un ratio mucho menor, se asume que por probabilidad las células deberían haber incorporado también el otro plásmido de interés. No obstante, posteriormente, se seleccionaron aquella agrupación de células que respondieron ante el estímulo específico para cada ruta molecular y el resto de las células se desecharon.

Todos las líneas celulares estables se crearon siguiendo las pautas anteriores, con excepción de las NIH3T3-NucLight-Red y HaCaT-NucLight-Red que fueron creadas a partir de NIH3T3 y HaCaT, respectivamente, mediante el kit comercial de lentivirus NucLightRed de IncuCyte (Essen Bioscience; Hertfordshire, GB). En este caso, se incorporó mediante infección a través de lentivirus de ADN que portaban información para la proteína nuclear mKate2 fluorescente roja y el plásmido para la resistencia a puromicina que sirvió para seleccionar las células.

2. Transfección transitoria

Para los experimentos de agonismo de PPAR γ/α , así como para los modelos de sobreexpresión de IKK α e IKK β se utilizó la línea celular 293T. En todos los casos las células fueron transfectadas utilizando el agente de transfección PEI. Por un lado, para la sobreexpresión de PPAR γ/α se aplicó una mezcla de 1.5 μ l de PEI con 0.2 μ g del plásmido de PPAR γ o PPAR α , según corresponda, y 0.8 μ g del plásmido Gal4-Luc. Por otro lado, para la sobreexpresión de IKK α/β se aplicó una mezcla de 2.5 μ l PEI con 0.001 μ g del plásmido KBF-Luc y 0.001 μ g de plásmido IKK α o IKK β . Para todos los casos, las células fueron incubadas con estas mezclas durante 5 h en condiciones óptimas 37 °C y 5 % CO₂ después, se retiró el medio y se cambió por medio de cultivo completo.

3. Determinación de la actividad transcripcional por luminiscencia

Para analizar la actividad transcripcional por luminiscencia, las células deben presentar insertado un plásmido con el gen que codifica para la enzima luciferasa. Las células se trataron de manera indicada (Tabla 3) y se lisaron con el buffer de lisis (Tris-fosfato 25 mM pH 7.8, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 al 1% y glicerol al 7%) durante 15 min en agitación. Por último, la placa fue introducida en el lector de microplaca Berthold LB942 Tristar 2 (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad,

Línea celular	Diana molecular	Densidad celular	Preincubación (20 min)	Estímulo o inductor	Tiempo incubación	Buffer lisis	Luciferina	Placa
NIH3T3-KBF-Luc	Inhibición de NF-κB	1 x 10 ⁴	Sí	TNF-α 30 ng/ml (Immunotools; Friesoythe, Alemania)	6 h	50 μl	25 μl	P96
HaCaT-KBF-Luc	Inhibición de NF-κB	2 x 10 ⁴	Sí					
Raw264.7-STAT3-Luc	Inhibición de STAT3	5 x 10 ⁴	Sí	LPS 1 μg/ml (Merck KGaA)				
HaCaT-ARE-Luc	Inducción de Nrf2	2 x 10 ⁴	No	TBHQ 20 μM (Merck KGaA)				
293T-CB1-CRE-Luc	Agonismo de CB ₁	5 x 10 ⁴	No	WIN55-212.2 1 μM (Enzo Life Technologies, Farmingdale, NY, USA)				
293T-CB1-CRE-Luc	Antagonismo de CB ₁	5 x 10 ⁴	Sí					
293T-CB2-CRE-Luc	Agonismo de CB ₂	5 x 10 ⁴	Sí	WIN55-212.2 1 μM y FSK 10 μM (Merck KGaA)				
HaCaT-EPO-Luc	Inducción de HIF-1α	2 x 10 ⁴	No	DFX 150 μM (Merck KGaA)				
HaCaT-EPO-Luc	Inhibición de HIF-1α	2 x 10 ⁴	Sí					
NIH3T3-EPO-Luc	Inducción de HIF-1α	1 x 10 ⁴	No					
NIH3T3-EPO-Luc	Inhibición de HIF-1α	1 x 10 ⁴	Sí					
NIH3T3-COL1A2-Luc	Inducción de COL1A2	1 x 10 ⁴	No	TGF-β1 10 ng/ml (Immunotools)	24 h			
HaCaT-FLG-Luc	Inducción de FLG	15 x 10 ⁴	No	CaCl ₂ 1.2 mM (Merck KGaA)	72 h			
293T	Agonismo de PPARγ	1 x 10 ⁵	No	Rosiglitazone 1 μM (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA)	6 h	100 μl	50 μl	P24
293T	Agonismo de PPARα	1 x 10 ⁵	No	WY1463 5 μM (Tocris; Bristol, GB)				
293T	Actividad de IKKα	5 x 10 ⁴	No	-				
293T	Actividad de IKKβ	5 x 10 ⁴	No	-				

Tabla 3. Especificaciones para cada ensayo de medición de la actividad transcripcional mediante luciferasa. Tipo celular empleado para cada ensayo, ya sea establemente transfectado o de transfección transitoria; diana molecular; densidad celular de siembra para cada experimento (células/pocillo); si se requiere preincubación con los ingredientes a testar para luego añadir el estímulo inductor de la actividad; horas de incubación del experimento; volumen del buffer de lisis utilizado (µl/pocillo); volumen de luciferina inyectada (µl/pocillo); tipo de placa (P96: 96 pocillos o P24: 24 pocillos).

Alemania) el cual inyecta la luciferina (Promega, Madison, WI, USA), reaccionando con la luciferasa presente en el lisado celular y generando luminiscencia cuya actividad fue medida en unidades relativas de luz (RLU).

4. Evaluación de la citotoxicidad y la proliferación

Las células NIH3T3-NucLight-Red y HaCaT-NucLight-Red fueron sembradas a una densidad de 5×10^3 en placa de 96 pocillos (P96) e incubadas toda la noche. Para el caso de citotoxicidad, las células fueron estimuladas con los ingredientes a testar, mientras que en la proliferación las células se estimularon con los ingredientes en medio sin suero, empleando el FBS al 10 % como control positivo de proliferación. En ambos casos, se evaluó la fluorescencia emitida por la proteína nuclear mKate2 a las 24 y 48 h de incubación a través del sistema de imagen IncuCyte FLT del IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience; Hertfordshire, GB). Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje de viabilidad.

Para evaluar la toxicidad de los ingredientes en las células B16, se sembraron 5×10^3 células/pocillo en placa P96 y se estimularon al día siguiente con los ingredientes a las concentraciones correspondientes en medio con YOYO-1 (Thermo Fisher Scientific). El YOYO-1 es un reactivo fluorescente que se diluye en medio a $0.1 \mu\text{M}$ y es capaz de permear dentro de las células cuando la membrana plasmática se encuentra dañada. Esto provoca la tinción del ADN y, por lo tanto, la emisión de fluorescencia. Después de 72 h, se añadió 0.0625 % de Tritón X-100 sobre los pocillos control para permeabilizar la célula y obtener la mayor tinción de ADN por YOYO-1, permitiendo normalizar los resultados de fluorescencia obtenidos con el sistema de imagen IncuCyte FLT del IncuCyte ZOOM y expresarlos como porcentaje de viabilidad.

5. Ensayo de cicatrización de la herida

Las células HaCaT y NIH3T3 se sembraron a 25×10^3 células por pocillo en placas P96 específicas para este ensayo denominadas ImageLock (Essen Bioscience) incubándose toda la noche para permitir su adherencia a la placa. A continuación, cuando en el pocillo alcanzó una confluencia celular en torno al 90%, se realizó la herida en la zona central del pocillo a través del dispositivo Wound Maker (Essen Bioscience). Durante las 48 h posteriores, se fue monitorizando el cierre de la herida tomándose imágenes cada 3 h empleando el sistema de imagen de migración y

cicatrización celular de IncuCyte ZOOM. La cuantificación se evaluó como porcentaje de confluencia de la herida.

6. Medida de los niveles de ROS

Se emplearon las células HaCaT a una densidad de 15×10^3 células por pocillo en placas P96, al día siguiente se pre-incubaron 20 min con los ingredientes de interés y como control positivo de antioxidación con N-acetil cisteína 15 mM (NAC). A continuación, se añadió el tert-butil-hidroperóxido (TBHP) 400 μ M, el cual es un inductor de la producción de ROS, incubándose durante 3 h en condiciones de oscuridad, 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió 100 μ l por pocillo de la sonda diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) a 1 μ M, incubándose 20 min a 37 °C en oscuridad. Esta sonda se utiliza como indicador de ROS debido a que, tras la disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares y su oxidación, se transforma en 2,7-diclorodihidro fluoresceína el cual es altamente fluorescente. Acto seguido, se realizó un lavado con PBS y se procedió a la medición de la fluorescencia captada con el sistema de imagen IncuCyte FLT del IncuCyte ZOOM, siendo expresada como porcentaje de producción de ROS.

7. Ensayo de autofagia

La medición de la actividad autofágica se llevó a cabo en las células HaCaT, las cuales se sembraron a una densidad de 75×10^3 células/pocillo en placas negras P96. Al siguiente día, el medio fue retirado y se estimuló con los ingredientes a las dosis indicadas en medio de cultivo de sales equilibradas de Earle (Merck KGaA) durante 48 h. Como control de inducción de la autofagia se utilizó Verapamil 10 μ M. A continuación, se empleó el kit de detección de autofagia CYTO ID (Enzo Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La captación de fluorescencia emitida por la sonda se llevó a cabo mediante el sistema de imagen IncuCyte FLT del IncuCyte ZOOM, cuantificándose y siendo expresada como porcentaje de autofagia.

8. Ensayo de agonismo y antagonismo del receptor vanilloide 1 (TVR-1)

Las células 293T-VR1 fueron cultivadas a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placa P96. Al día siguiente, las células fueron estimuladas con las dosis e ingredientes deseados o 10 μ M de Capsacepina, un antagonista de los canales TRPV-1, en medio con YOYO-1. Para el antagonismo, se esperó 20 min y se añadió Capsaicina (agonista de TRPV-1) a 1 μ M en todos los pocillos. Después de 3 h de incubación, se

añadió 0.0625 % de Tritón X-100 para normalizar los resultados de fluorescencia obtenidos con el sistema de imagen IncuCyte FLT del IncuCyte ZOOM y expresados finalmente como porcentaje de viabilidad.

9. Medición de la oxidación total

Este ensayo se basa en una reacción química de donación de átomos de hidrógeno (o un electrón), en la que el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable cuya coloración púrpura se puede reducir dando lugar a una coloración amarilla. Se trata de un sistema acelular en el que las muestras se diluyeron en 1 ml de metanol y se mezclaron con DPPH a 0,125 mM. Como control positivo de antioxidación se utilizó 200 μ M de Trolox. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió la absorbancia a 517 nm mediante el espectrofotómetro Genesys 50UV (Thermo Fisher Scientific). Los valores obtenidos fueron expresados y representados como porcentaje de oxidación, tomando como referencia el valor del DPPH.

10. Actividad tirosinasa en melanocitos

Las células B16 fueron sembradas a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placa P24. Al día siguiente, los melanocitos se incubaron con las dosis indicadas de ingredientes durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂. El 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a 0.1 mM fue utilizado como inductor de la enzima tirosinasa, mientras que el ácido kójico a 2 mM fue usado como control positivo de inhibición. Posteriormente, las células se lisaron durante 30 minutos a 4 °C con un tampón de lisis (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8, Triton X-100 al 1%, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas: leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml, pepstatina 1 μ g/ml y PMSF saturado 1 μ l/ml. Acto seguido, el lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a una placa P96, añadiéndose el precursor de melanina L-DOPA a 1.25 mM, en tampón fosfato 20 mM, pH 6.8 y se incubó a 37 °C durante 2 h. La actividad de la enzima tirosinasa fue evaluada debido a que cataliza la conversión de L-DOPA a Dopacromo lo que provoca un cambio de absorbancia cuya medida fue detectada a 450 nm en el lector de microplaca Berthold LB942 Tristar 2.

11. Producción de melanina

Las células B16 fueron sembradas a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placa P24. Al día siguiente fueron estimuladas con las dosis correspondientes de los

ingredientes e incubadas durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Al igual que en el ensayo de tirosinasa, los controles empleados fueron el IBMX a 0.1 mM y el ácido kójico a 2 mM. A continuación, las células fueron lavadas en PBS y centrifugadas, disolviéndose el sedimento en NaOH 1 M durante 30 min a 60 °C. Finalmente, se evaluó la producción de melanina midiendo la absorbancia a 405 nm en el lector de microplaca Berthold LB942 Tristar 2.

12. Actividad hialuronidasa

Es un método turbidimétrico que se basa en que el ácido hialurónico reacciona con la albúmina acidificada formando un precipitado blanco. De tal forma, que cuanto mayor sea la actividad hialuronidasa, se degradará más ácido hialurónico y, por tanto, reaccionará menos con la albúmina acidificada disminuyendo la cantidad de precipitado y por ende la turbidez. Concretamente, este experimento consiste en mezclar 0.750 ml de solución de enzima (6 unidades hialuronidasa/ml) y 0.250 ml de diluyente enzimático (Na₃PO₄ 20 mM, NaCl 77 mM y albúmina de suero bovino al 0.01 % (p/v), pH 7.0 a 37 °C). A continuación, las muestras a testar fueron agregadas a las dosis indicadas. El diluyente enzimático se usó como control negativo. Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 10 minutos. Inmediatamente, se añadió la solución de ácido hialurónico al 0.03 % (p/v) en tampón fosfato, se mezcló por agitación y se incubó a 37 °C durante exactamente 45 minutos. Después, se transfirieron 0.5 ml de la muestra a cubetas con 2.5 ml de solución de albúmina ácida (acetato de sodio 24 mM, ácido acético 79 mM con albúmina de suero bovino al 0.1 % (p/v), pH 3.75 a 25 °C), mezclando inmediatamente por inversión. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro Genesys 50UV. La actividad de hialuronidasa se expresa como unidades/ml de enzima, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción y el factor de dilución de la enzima.

13. Detección de proteínas por *Western Blot*

Las células fueron recolectadas mediante tripsina y lavadas 2 veces con PBS frío, obteniendo el pellet celular después de centrifugar 2 min a 13000 rpm y a 4 °C. A continuación, los extractos celulares fueron lisados durante 15 min en hielo con una solución de lisado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerol al 10 % y NP-40 al 1 %) suplementado con NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM y los inhibidores de proteasas leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF saturado 1 µl/ml.

Pasado ese tiempo, se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4 °C y se calculó la concentración de proteínas de cada una de las muestras con el método Bradford. Por último, se añadió solución Laemmli 1x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS al 10 %, glicerol al 30 %, DTT al 10 % y azul de bromofenol al 0.012 %) y se hirvieron las muestras 3 min a 95 °C para desnaturalizar las proteínas. Aplicando un voltaje de 80-90 V a su paso por el gel concentrador y de 120 V por el gel separador de poliacrilamida con SDS, las proteínas se separaron para después ser transferidas a membranas de PVDF utilizando un voltaje de 24 V durante 30 min. Para las proteínas fosforiladas, las membranas se incubaron con tampón de bloqueo basado en albúmina de suero bovino al 5 % en TRIS-buffer salino y Tween-20 al 0.1 % (TBST), mientras que, para las proteínas no fosforiladas, en leche en polvo sin grasa al 5 %; en ambos casos se incubó 1 h en agitación y a temperatura ambiente. Acto seguido, se añadió el anticuerpo primario correspondiente quedándose toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBST y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado. Por último, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min con TBST y se reveló mediante quimioluminiscencia empleando el kit Westar Nova 2011 (Cyanagen Srl; Bolonia, Italia) que se basa en una mezcla de luminol mejorado con peróxido en un ratio 1:1. La señal de la proteína fue obtenida a través de ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare; Chicago, Illinois, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron p-NF- κ B/p65 (Ser536), p-I κ B α (Ser32/36) (5A5), SQSTM1/p62 adquiridos a Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); Citoqueratina-16 (LL025), NF- κ B/p65 (F-6), I κ B α (C-21), MITF (21D1428), TRP1 (A20), TRP2 (D-18), Tirosinasa (M-19) y α -Actina (1A4) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) y α -Tubulina de Merck KGaA. En todos los casos, los anticuerpos se emplearon a la dilución recomendada por el fabricante.

14. Modelo animal para el estudio de los efectos del CBD en piel

Se utilizaron ratones hembra BALB/cByJRj de seis meses de edad adquiridos en Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales fueron distribuidos en tres grupos aleatoriamente: grupo control (n=3), tratamiento CBD 0.1 % (n=6) y tratamiento CBD 1 % (n=6). Se mantuvieron a 20–22 °C, en condiciones constantes de luz (14 h de luz) y 40-50 % de humedad relativa, teniendo libre acceso a una dieta estándar y agua. Se realizó un tratamiento de 5 días de duración, consistente en la aplicación tópica

diaria del vehículo (DMSO al 10 % en propilenglicol), CBD al 0.1 % y CBD al 1 % en la región de la espalda de los ratones los cuales fueron previamente rasurados.

Concluido el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se recogió la piel de la región de la espalda sometida al tratamiento. De cada muestra, una parte se fijó en paraformaldehído al 4 % y se embebió en parafina para su posterior análisis histológico, mientras que la otra parte se dedicó para extraer ARN. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de la Unión Europea y el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (2014PI/025).

15. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN extraído de la piel de los ratones y del cultivo celular de HEK se llevó a cabo usando el kit RNeasy (Qiagen; Hilden, Alemania). A continuación, a partir de 500 ng de ARN por muestra se obtuvo ADNc empleando el kit Omniscript RT (Qiagen) suplementado con el inhibidor de RNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc fue analizado usando TaqMan Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific). La expresión génica fue determinada usando Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems; Foster City, California, E.E.U.U.) mediante el método comparativo $\Delta\Delta CT$. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se normalizaron con el gen constitutivo HPRT1. Los cebadores utilizados fueron comprados a Eurofins MWG (Eurofins Scientific Group; Ebersberg, Alemania) cuya secuencia se detalla en la tabla 4.

Cebador	Especie	Secuencia
H-SQSTM1 f	Humano	5'-CTGGGACTGAGAAGGCTCAC-3'
H-SQSTM1 r		5'-GCAGCTGATGTTTGGAAAT-3'
M-SQSTM1 f	Ratón	5'-GCCAGAGGAACAGATGGAGT-3'
M-SQSTM1 r		5'-TCCGATTCTG GCATCTGTAG-3'
SQSTM1		Hs01061917_g1 SQSTM1 TaqMan (s)
H-HMOX1 f	Humano	5'-CTCAAACCTCCAAAAGCC-3'
H-HMOX1 r		5'-TCAAAAACCAACCCCAACCC-3'
M-HMOX1 f	Ratón	5'-CCTCACTGGCAGGAAATCATC-3'
M-HMOX1 r		5'-CCTCGTGGAGACGCTTTACATA-3'
HMOX		Hs01110250_m1 HMOX1 TaqMan (s)
H-CK16 f	Humano	5'-ACACATCCGTGGTGCTATCCA-3'
H-CK16 r		5'-GGTTGGCACAAGCTTCTTGA -3'
M-CK16 f	Ratón	5'-ACAGCACTCCTCTGGACAGTCC-3'
M-CK16 r		5'-CATTAGTCCCTGGAAGTCTGAC-3'
HPRT1		Hs02800695_m1 HPRT1 TaqMan (s)

Tabla 4. Sondas, cebadores y sus secuencias utilizadas en ensayos de RT-qPCR

16. Estudio histológico de las muestras de piel

Las secciones de piel (5 μ M) fueron desparafinadas y rehidratadas mediante incubaciones sucesivas en xilol, etanol al 100 %, etanol al 96 %, etanol al 80 % y agua. A continuación, se tiñeron con hematoxilina durante 5 min y luego se lavaron en agua. Una vez enjuagadas, las secciones fueron teñidas con eosina 30 s y deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol. Finalmente, después de un baño de xileno de 2 minutos, las muestras fueron preparadas para su análisis al microscopio.

Para el análisis inmunohistoquímico de la piel, las muestras se cubrieron con el buffer citrato sódico 10 mM, pH 6 y se sometieron a 98 °C para producir el desenmascaramiento antigénico. Tras enfriarse, se realizaron 2 lavados de 3 min con 0.1 % de PBS-Tween-20 y se bloqueó la peroxidasa endógena utilizando el reactivo de bloqueo EnVision FLEX-peroxidasa (Agilent Dako; Glostrup, Dinamarca) durante 10 min. El bloqueo de las uniones inespecíficas se llevó a cabo mediante la incubación con BSA al 3 %, 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente, se hicieron 2 lavados de 3 min con 0.1 % de PBS-Tween-20 y se incubó 4 h con el anticuerpo secundario apropiado (Merck Millipore; Billerica, MA, USA) a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario asociado a EnVision FLEX/HRP (Agilent Dako) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección se utilizó el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (Merck Millipore). Finalmente, las muestras se deshidrataron y montaron, las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Leica DM2000 y la cámara digital Leica MC190 (Leica; Wetzlar, Alemania).

17. Ensayo clínico de reducción de la hiperpigmentación

El ensayo fue llevado a cabo por la empresa Bionos Biotech (Valencia, España) con un total de 20 voluntarios en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España). Los pacientes fueron tratados tópicamente en la región facial con crema basada en la combinación C-HP, con una posología de dos veces al día durante 56 días. Antes de empezar el tratamiento, se tomaron imágenes de cada voluntario con Bio Blue Light Scanner (Bionos Biotech) y también a los 28 y 56 días de tratamiento. Este dispositivo consiste en la adquisición de imágenes a través de una cámara de alta resolución Dalsa TS 5 Mp (Teledyne Dalsa; Waterloo, ON, Canadá) con óptica Schneider APO-Xenoplan (Schneider opticals; Fronhausen, Alemania) y un sistema de

luz difusa e indirecta (tipo Domo) que emite a 470 nm, permitiendo visualizar las manchas oscuras en monocromático. Las imágenes fueron procesadas con un software específico basado en Matrox Imaging Library (Matrox; Montreal, Canadá) y en ellas se seleccionó la región de interés sobre la cual se evaluaron tres parámetros: área total de manchas oscuras, número total de manchas oscuras y contraste entre el color de piel normal y la región de la piel que contiene la mancha. Además, al final del ensayo, cada voluntario respondió un cuestionario sobre el producto aplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t de *Student* pareadas, ya que cada voluntario muestra un par de valores (antes y después del tratamiento).

18. Eficacia antimicrobiana del CBD

La actividad antimicrobiana del CBD fue analizada por Eurofins Biopharma (Barcelona, España) mediante la determinación de la susceptibilidad de microorganismos a CBD. Para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizaron diluciones seriadas del CBD en placa P96 y sobre cada pocillo se inoculó *P. acnes*. Además, se utilizó un control de crecimiento, un control de esterilidad y un control de turbidez. Después de la incubación, se analizó la turbidez de los pocillos la cual está relacionada directamente con el crecimiento microbiano. Por otro lado, para la obtención del valor de la concentración mínima bactericida (CMB), se realizó por conteo microbiano utilizando el método de cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC), inoculando *P. acnes* en placas de agar con diferentes dosis de CBD y realizando el conteo de UCF a diferentes tiempos.

19. Análisis transcriptómico (RNA-Seq)

Las células HEK previamente tratadas 24 h con CBD a 10 μ M o vehículo, fueron recolectadas y lisadas con Qiazol (Qiagen) para extraer el ARN total, el cual se purificó con el kit miRNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Las muestras de ARN (1 μ g) fueron enviadas al Centro de Regulación Genómica (CRG; Barcelona, España) donde se procesó para obtener una secuenciación de alto rendimiento utilizando el kit TruSeq mRNA Sample Prep v2 (RS-122-2001) (Illumina; San Diego, CA, USA) y se construyó una biblioteca de ADN copia por purificación con poliA. Por último, se secuenció esta biblioteca con el sistema Illumina HiSeq 2500 (Illumina) con lecturas de 50 pb de extremo único y ~ 30 millones de lecturas por muestra.

20. Análisis proteómico (SWATH LC-MS/MS)

Las proteínas de las células HEK fueron enviadas a la Unidad del Proteómica del CRG y previamente obtenidas mediante la lisis celular con tampón NP-40 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerol al 10 % y NP-40 al 1 %) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. A continuación, se eliminaron los contaminantes por precipitación de proteínas con ácido tricloroacético al 10 % y acetona y se solubilizaron en 50 µl de RapiGest SF al 0.2 % (Waters; Milford, MA, USA) en bicarbonato de amonio 50 mM. Los extractos de proteínas se sometieron a digestión con tripsina. La cantidad total de proteína se cuantificó usando el kit fluorimétrico Qubit (Thermo Fisher Scientific), reservándose 50 µg de proteína para incubar con DTT 5 mM a 60 °C durante 30 min y, posteriormente, con iodoacetamida 10 mM a temperatura ambiente y en oscuridad otros 30 min. A continuación, se añadió tripsina modificada de grado secuenciación (Promega) en un ratio tripsina/proteína de 1:40 y se incubaron las muestras a 37 °C durante 2 h, transcurrido este tiempo, se volvió a añadir tripsina incubando durante 15 h. La eliminación del RapiGest se hizo por precipitación, al incubar 1 h a 37 °C con ácido trifluoro acético (TFA) al 0.5 % y separando por centrifugación. Finalmente, se añadió agua Milli-Q y acetonitrilo (ACN) ajustando el volumen hasta alcanzar una concentración de 0.5 µg de péptido/µl (2.25 % de ACN y 0.2 % de TFA).

La librería de espectros fue obtenida por análisis de los péptidos mediante una aproximación basada en proteómica *shotgun* con nano LC-MS/MS. Se inyectó 2 µl (1 µg en columna) con un sistema de cromatografía nanoLC Ekspert nLC415 (Eksigent; Dublin, CA, USA) para lo que se empleó una columna C18 Acclaim PepMap 100 (75 µm x 25 cm, 3 µm, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) con 300 nl/min de flujo. Se empleó ácido fórmico 0.1 % en agua o en ACN como solventes A y B, respectivamente, utilizando el siguiente gradiente: de 0 a 5 min B 5 %, 5 a 125 min B 5 % a B 30 %, a continuación 9 min B 95 % y finalmente 9 min B 5 % para equilibrar la columna. Los péptidos eluidos se introdujeron en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo/TOF Triple TOF 5600+ (Sciex; Framingham, MA, CA, USA) mediante un sistema de adquisición dependiente de datos (*data dependent acquisition*, DDA) *top* 65, en modo iónico positivo. Mediante la fuente de ionización NanoSpray III ESI (Sciex; Framingham, MA, CA, USA) con un voltaje de 2600 V se llevó a cabo la conexión entre el sistema de cromatografía nanoLC y el espectrómetro de masas. La adquisición se

realizó a 250 ms y consistió en un *survey scan* de 350 a 1250 m/z , a continuación, se realizó el análisis MS/MS de los 65 iones precursores de mayor intensidad en intervalos de 60 ms, en el rango de 230 a 1500 m/z .

21. Análisis de datos transcriptómico y proteómicos

En cuanto a los datos transcriptómicos, las lecturas de RNA-Seq fueron procesadas con Trimmomatic v0.36 (171) alineándose con el ensamblaje del genoma humano hg38 usando HISAT2 v2.1.0 (172). Los recuentos por gen se obtuvieron con featureCounts v1.6.1 (173) mientras que se utilizó DESeq2 v1.20.0 (174) para el análisis de la expresión diferencial, excluyéndose aquellos genes con menos de 15 recuentos en todas las muestras.

Con los datos proteómicos se identificó proteínas y péptidos a partir de las *shotgun* DDA usando ProteinPilot v5.0 (Sciex; Framingham, MA, USA) y la base de datos de proteínas humanas SwissProt (175). A continuación, se construyó una biblioteca espectral, usando MS/MSall con SWATH Acquisition MicroApp v2.0 (Sciex), con aquellos péptidos que aparecieron en la búsqueda y que tuvieron una confianza superior al 99 %. A través de PeakView v2.1 (Sciex) se realizó la ejecución de SWATH, asistida por la biblioteca, y se calibró el tiempo de retención utilizando MS/MSall con SWATH Acquisition MicroApp v2.0 (Sciex) con un umbral de tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1 % y 50 ppm de tolerancia. Por último, se normalizó la señal usando MarkerView v1.2.1 (Sciex).

El análisis de abundancia diferencial se realizó mediante la aplicación prueba T de dos muestras de *Welch* para comparar áreas SWATH normalizadas entre los diferentes grupos. Para el análisis funcional, se seleccionaron los genes con un P ajustado < 0.05 y un cambio de veces de inducción absoluto > 2 y proteínas con un P ajustado < 0.05 y un cambio de veces de inducción absoluto > 1.5 para realizar un análisis de sobrerrepresentación. Para ello, se requirió la herramienta EnrichR (176) utilizando Gene Ontology (177), Wikipathways (178) y JASPAR (179). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes para datos transcriptómicos con el paquete fgsea v1.9.7 (180), utilizando los mismos genes clasificados previamente en la lista completa de genes con una transformación de \log_2 veces de inducción.

Todos los P-valores de los diferentes análisis se ajustaron para controlar la FDR utilizando la aproximación de Benjamini y Hochberg (181). Los datos de RNA-seq se

han depositado en el banco de datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el identificador de conjunto de datos GSE131565 (182). Los datos de espectrometría de masas de proteómica se han depositado en el ProteomeXchange Consortium (183) a través del repositorio asociado PRIDE (184) con el identificador de conjunto de datos PXD013956.

22. Análisis de los datos de la plataforma SimDerma

Los datos experimentales resultantes de la plataforma SimDerma han sido almacenados para formar una base de datos que, posteriormente, se ha transferido a otra base de datos con estructura SQL (lenguaje de consulta estructurado) para su posterior análisis utilizando el software HeidiSQL v10.2 (Ansgar Becker, 2002). Todos los ingredientes testados se clasificaron según su actividad para cada diana molecular en

	Actividad			Sin actividad
	Alta	Moderada	Baja	
Proliferación (% Viabilidad)	% > 300	300 < % < 200	200 < % < 150	% < 150
Cicatrización (% Confluencia)	% > 75	75 < % < 50	50 < % < 25	% < 25
Inducción ROS (% Producción ROS)				
Agonismo CB ₁ (% Actividad)				
Antagonismo TRPV-1 (% Viabilidad)				
Inhibición NF-κB (% Actividad)	% < 25	25 < % < 50	50 < % < 75	% < 75
Inhibición STAT3 (% Actividad)				
Inhibición NRF2 (% Actividad)				
Anti-oxidación (% Actividad oxidante)				
Inhibición ROS (% Producción ROS)				
Antagonismo CB ₁ (% Actividad)				
Agonismo CB ₂ (% Actividad)				
Agonismo TRPV-1 (% Viabilidad)				
Actividad tirosinasa (% Actividad tirosinasa)				
Producción melanina (% Producción melanina)				
Inhibición HIF-1α (% Actividad)	X > 10	4 < X < 10	2 < X < 4	X < 2
Agonismo PPARα (veces de inducción)				
Agonismo PPARγ (v. inducción)				
Inducción NRF2 (v. inducción)				
Autofagia (v. inducción)				
Inducción HIF-1α (v. inducción)				
Inducción COL1A2 (v. de inducción)				
Inducción de FLG (v. de inducción)				

Tabla 5. Criterios utilizados para la clasificación de los ingredientes según su actividad para cada diana molecular. %= porcentaje de actividad del ingrediente, X= veces de inducción del ingrediente, en ambos casos para cada actividad.

actividad alta, moderada, baja o sin actividad. Para ello, se evaluó los criterios de actividad para cada experimento como muestra en la tabla 5.

23. Análisis estadístico

A excepción de los ensayos clínico, proteómico y transcriptómico cuyos análisis estadístico se menciona en su respectivo apartado, el análisis estadístico del resto de ensayos fue llevado a cabo con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad; San Diego, CA, USA). Los datos de los experimentos *in vitro* fueron expresados como la media aritmética \pm desviación estándar. Para la comparación entre dos grupos se realizó la prueba t de *Student* (t-test) mientras que cuando había más grupos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida del test Newman-Keuls. Los valores con un p-valor < 0.05 (*) se consideraron significativos, los muy significativos tienen un p-valor < 0.01 (**) y los altamente significativos un p-valor < 0.001 (**).

IV. Resultados

*1. La plataforma de cribado SimDerma
como herramienta para la detección de
actividades de interés dermatológico*

1. La plataforma de cribado SimDerma como herramienta para la detección de actividades de interés dermatológico

La plataforma SimDerma surgió para el estudio masivo de ingredientes en experimentos con actividades biológicas de interés en alteraciones de la piel. Como se muestra en la figura 9, el proceso comienza con la recepción de la muestra en el laboratorio y su consiguiente codificación para permitir el mejor manejo de los datos e identificación. A continuación, se busca el disolvente más apropiado y se elaboran las dosis que, por defecto, son 10 y 100 µg/ml para extractos sólidos; 1/1000 (0.001 % vol/vol) y 1/100 (0.01 % vol/vol) para extractos líquidos; y 10 y 25 µM para compuestos puros.

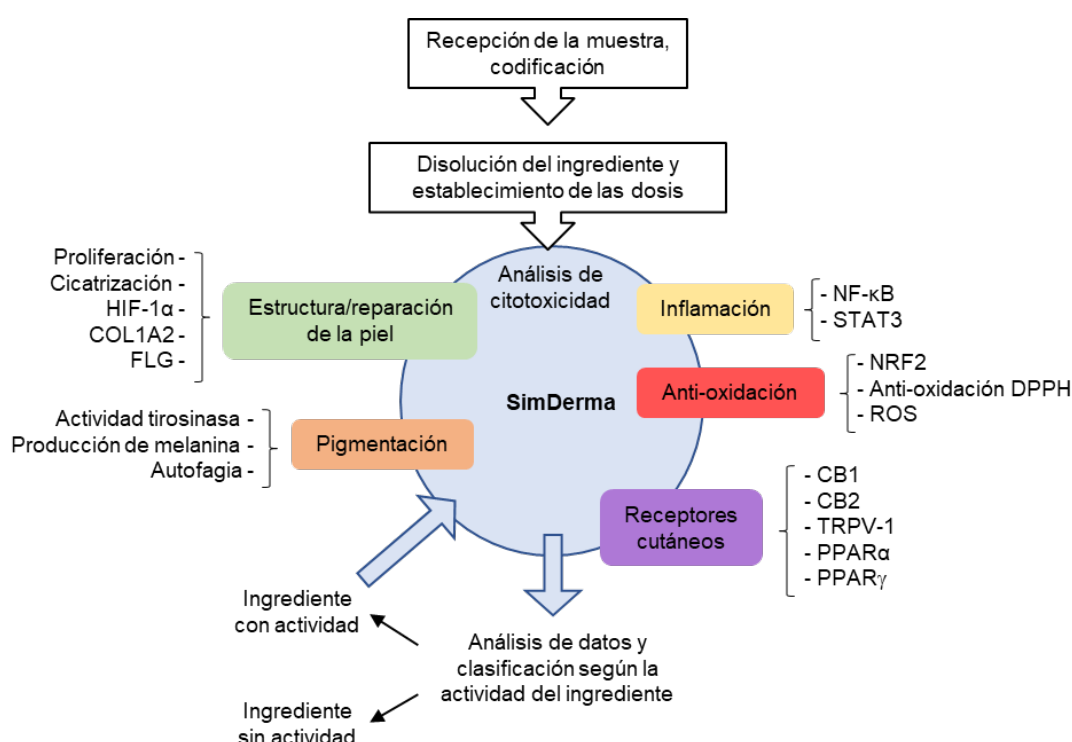


Figura 9. Esquema del procedimiento estándar seguido en la plataforma SimDerma para el estudio de las actividades biológicas de los ingredientes testados.

Inicialmente, se hace un análisis de citotoxicidad en fibroblastos NIH3T3 y queratinocitos HaCaT a 24 y 48 h para evaluar si alguna/s de las dosis a testar fueran citotóxicas. El resto de los experimentos se pueden clasificar en 5 bloques:

- **Estructura y reparación de la piel:** incluye ensayos de proliferación, cicatrización y evaluación de la actividad transcripcional de HIF-1α en fibroblastos y queratinocitos, actividad transcripcional de COL1A2 en fibroblastos y análisis de la actividad transcripcional de filagrina en queratinocitos.

- **Inflamación:** está constituido por el estudio transcripcional de NF- κ B en fibroblastos y queratinocitos y STAT3 en macrófagos.

- **Anti-oxidación:** evaluación de la actividad transcripcional de NRF2, producción de ROS en queratinocitos y el ensayo de anti-oxidación por DPPH en un modelo celular.

- **Pigmentación:** incluye análisis de la actividad tirosinasa y la producción de melanina en melanocitos, así como la medición de la actividad autofágica en queratinocitos.

- **Receptores cutáneos:** análisis de la actividad CB₁, CB₂, TRPV-1, PPAR α y PPAR γ . En todos los casos se ha empleado la línea 293T como modelo celular.

Finalmente, los datos obtenidos de cada experimento son analizados individualmente para cada ingrediente de tal forma que, el primer cribado permite asignar un tipo de actividad a cada ingrediente de la siguiente manera: sin actividad, actividad baja, actividad moderada o actividad alta. Aquellos ingredientes que son inactivos para una diana biológica no se realiza un segundo ensayo, en cambio, los que presentan actividad sí son repetidos, aunque en esta ocasión a tres dosis, incluyendo una dosis intermedia a las dosis del primer ensayo.

1.1 Clasificación de los ingredientes testados en la plataforma SimDerma

Actualmente la plataforma SimDerma está compuesta por 586 ingredientes, de los cuales el 66.2 % corresponden a compuestos puros extraídos químicamente, mientras que el 33.8 % restante son extractos naturales (Fig. 10A).

A su vez, los extractos naturales se pueden clasificar atendiendo a su origen, de tal modo que el 93.8 % proceden de plantas, el 5.7 % de algas y sólo el 0.5 % es de origen animal (Fig. 10B).

Además, los 586 ingredientes testados en la plataforma SimDerma han sido adquiridos de 38 proveedores diferentes, de los cuales solo 16 suponen un porcentaje mayor al 0.70 %, el resto están incluidos en la categoría de otros (Fig. 10C). Entre ellos, destaca de manera predominante Symrise con un 51.83 % de los ingredientes totales de SimDerma, siguiéndoles a gran distancia Indena con un 5.57 %, Gatefossé 4.52 % y Merck KGaA con un 4.17 %.

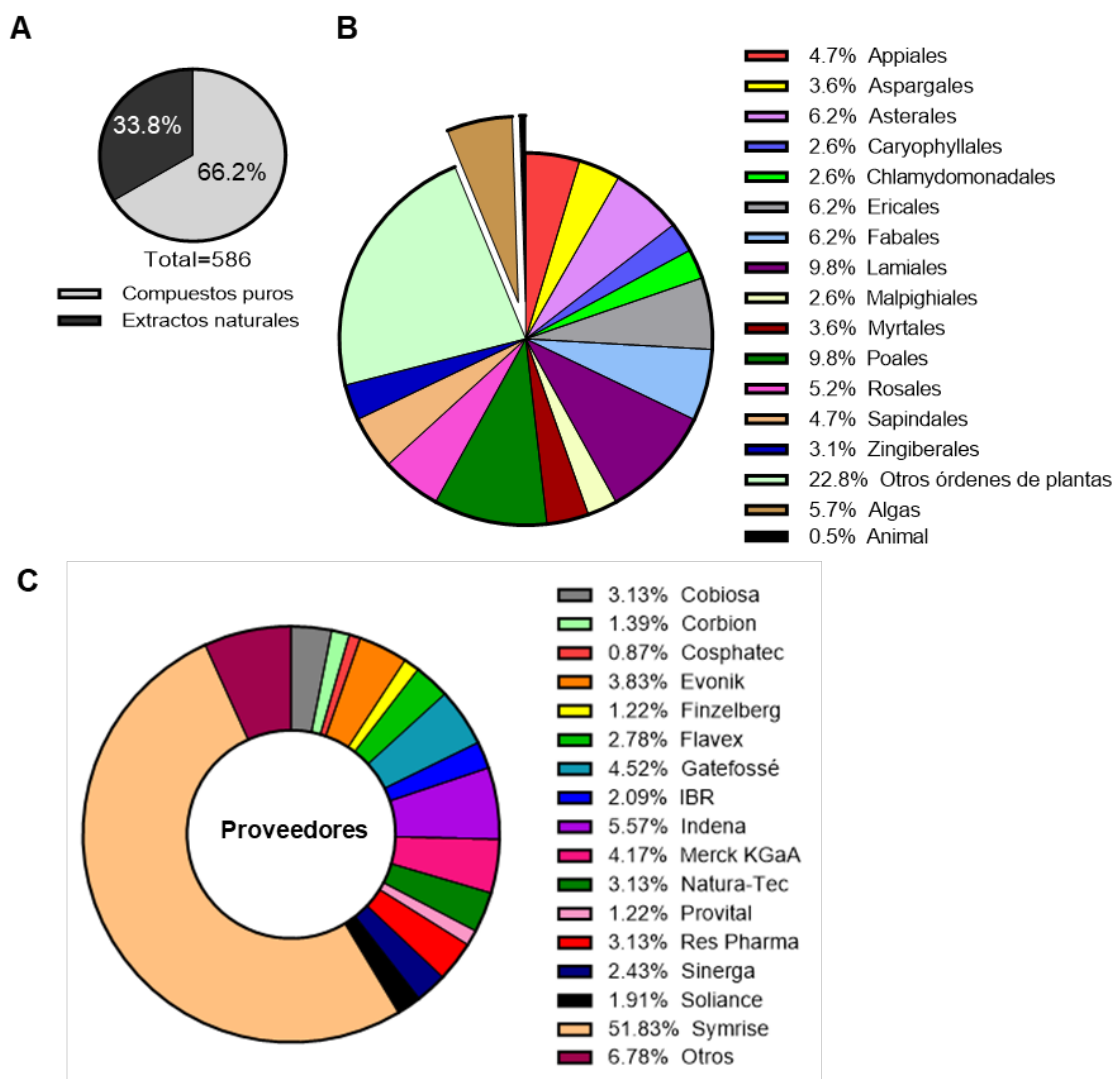


Figura 10. Clasificación de los ingredientes de la plataforma SimDerma según su origen. A. Naturaleza de los ingredientes. **B.** Clasificación de los extractos naturales. **C.** Proveedores de los ingredientes totales.

1.2 Análisis de los ingredientes testados en SimDerma según su actividad

En la figura 11A se desglosa el número de ingredientes que actualmente hay testados para cada ensayo. De tal modo que, el experimento en el que se han testado menos ingredientes es el que determina el agonismo de TRPV-1 (88 ingredientes), por el contrario, la actividad transcripcional de FLG es el experimento en el que se han testado un mayor número de ingredientes (554 ingredientes).

A continuación, se desglosa el porcentaje de ingredientes agrupados según la actividad que muestran para cada uno de los ensayos incluidos en SimDerma (Fig.11B-F). En el bloque de experimentos de estructura/reparación de la piel se puede observar que fueron pocos los ingredientes que mostraron una actividad alta, mientras que los

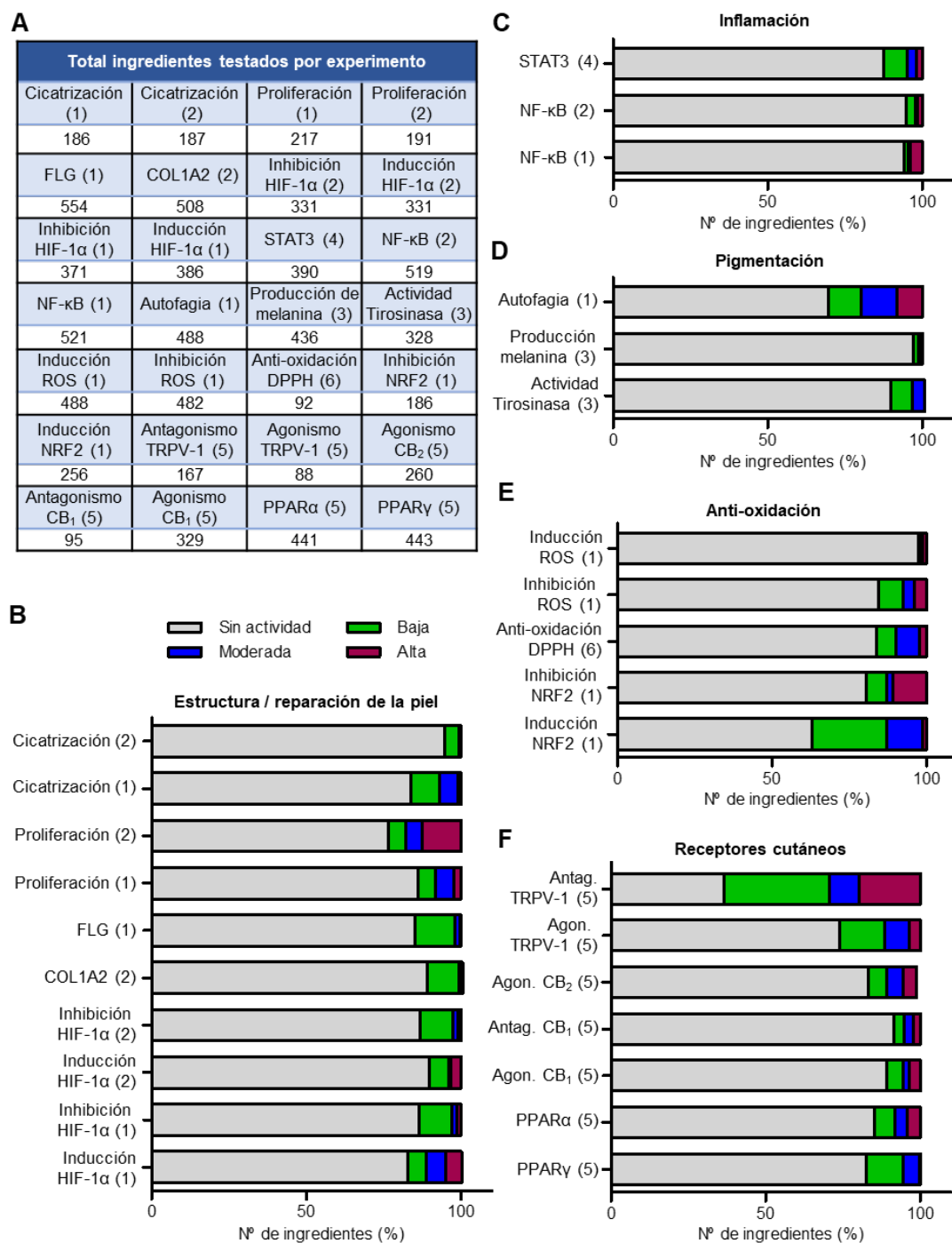


Figura 11. Experimentos constituyentes de la plataforma SimDerma. A. Tabla con el número de ingredientes totales testados para cada experimento que conforma la plataforma. B. Ensayos relacionados con la estructura y reparación de la piel. C. Ensayos de inflamación. D. Ensayos asociados a la pigmentación. E. Ensayos implicados en procesos de anti-oxidación. F. Experimentos relacionados sobre los efectos de los ingredientes en receptores cutáneos. Las gráficas B a F muestran el porcentaje del número de ingredientes agrupados según su efecto: sin actividad (gris), actividad baja (verde), moderada (azul) y alta (granate). El número después del tipo de ensayo indica el tipo celular donde se ha realizado, siendo (1) HaCaT, (2) NIH3T3, (3) B16, (4) RAW264.7, (5) 293T y (6) acelar.

ingredientes que mostraron una activada baja fue algo superior. De hecho, el experimento que presenta un mayor porcentaje de ingredientes activos en este bloque es el de proliferación en fibroblastos, alcanzando unos valores próximos al 25 %, que se

desglosan en actividad baja (5.8 %), actividad moderada (5.2 %) y actividad alta (12.6 %), el 76.4 % restante corresponde a ingredientes que no presentan actividad.

En el bloque de inflamación (Fig. 11C), el porcentaje de ingredientes activos es muy bajo. En este sentido, para el ensayo de actividad transcripcional de NF- κ B tanto en fibroblastos como en queratinocitos más del 94 % fueron ingredientes sin actividad, mientras que en el caso de STAT3 fue del 87.4 %.

En cuanto al análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de pigmentación se aprecia que, en el ensayo de autofagia el 69.6 % de los ingredientes son inactivos a pesar del número amplio de ingredientes testados. El resto de los ingredientes con actividad, se distribuyen en las 3 categorías de actividad en un porcentaje que se encuentra en torno al 10% en cada una de ellas. Por otro lado, solo el 11 % y el 2.7 % de los ingredientes fueron activos cuando se analizó la actividad tirosinasa y la producción de melanina, respectivamente (Fig. 11D).

Valorando los experimentos pertenecientes al grupo de anti-oxidación, cabe destacar, la presencia de una gran cantidad de ingredientes activos que son capaces de inducir la actividad transcripcional de NRF2 en queratinocitos, puesto que el 24.2 % de los ingredientes testados mostraron una actividad baja, el 11.7 % una actividad moderada y el 1.2 % alta. En el resto de los experimentos que componen este grupo, los ingredientes inactivos superaban el 80 % para cada uno de ellos (Fig. 11E).

Por último, en el grupo de experimentos que determinan la actividad de los receptores cutáneos, resalta los valores obtenidos para antagonismo de TRPV-1, ya que es el experimento de toda la plataforma SimDerma que más porcentaje de ingredientes activos presenta (63.5 %). Para el resto de los experimentos que involucran a los receptores cannabinoides (CB₁ y CB₂) y los receptores PPAR (PPAR α y PPAR γ) los ingredientes activos fueron inferior al 20 % en cada uno de ellos (Fig. 11F).

2. Estudio de los efectos biológicos del CBD en piel

2. Estudio de los efectos biológicos del CBD en piel

Uno de los ingredientes testados en la plataforma de cribado SimDerma es el cannabidiol (CBD). Debido al creciente interés que está teniendo este compuesto en la actualidad y las evidencias que han demostrado sus efectos beneficiosos para el tratamiento de patologías de diversa índole, incluidas las de la piel, se ha focalizado nuestro interés en hacer un estudio detallado de los efectos que tiene *in vitro* e *in vivo* y también de las rutas moleculares que se ven alteradas tras su aplicación.

2.1 Efecto antioxidante del CBD en queratinocitos

Para analizar el efecto antioxidante del CBD se recurrió al análisis de la actividad transcripcional de NRF2 y a la cuantificación de la producción de ROS en

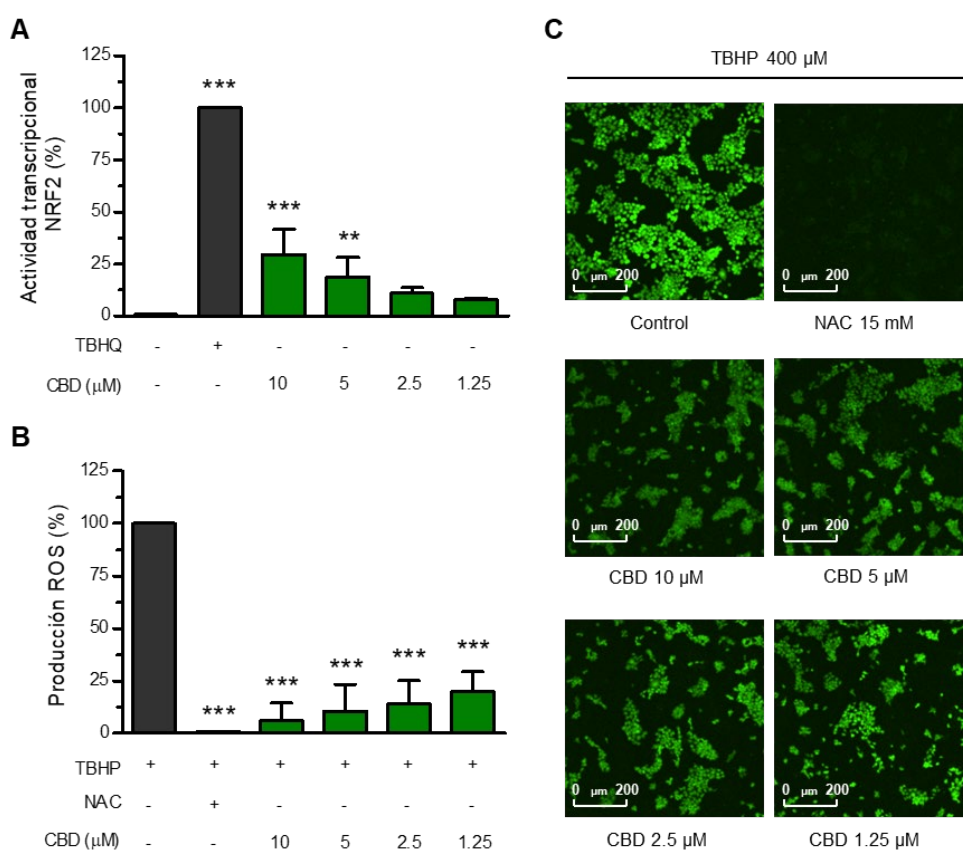


Figura 12. Efectos antioxidantes del CBD. **A.** HaCaT-ARE-Luc fueron estimuladas con el CBD a 10, 5, 2.5 y 1.25 μ M durante 6 h. TBHQ (20 μ M) fue utilizado como control de inducción de Nrf2. La luminiscencia (RLU) fue medida a través del lector Berthold Tristar2 y expresada como porcentaje de actividad de Nrf2 teniendo en cuenta que el valor del TBHQ equivale al 100 %. **B.** Inducción de ROS sobre las células HaCaT mediante el tratamiento con TBHP (400 μ M) e incubándose con diferentes dosis de CBD durante 3 h. El NAC (15 mM) fue utilizado como control de inhibición de ROS. La fluorescencia emitida por la sonda H2DCFDA (2 μ M) fue medida y analizada mediante el equipo IncuCyte ZOOM. Los valores fueron expresados como porcentaje de la producción de ROS, considerando el 100 % el valor alcanzado por TBHP. En ambas gráficas, los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes \pm DE. ** p <0.01; *** p <0.001 indica las diferencias significativas entre el control y las células tratadas con CBD. **C.** Imágenes representativas del ensayo de ROS tomadas con el IncuCyte ZOOM (objetivo 4x).

queratinocitos. La figura 12A muestra como el tratamiento durante 6 h con CBD indujo de manera significativa la activación transcripcional de NRF2 de manera dosis dependiente. Además, el tratamiento con esta molécula fue capaz de reducir los niveles de ROS inducidos por TBHP en células HaCaT. De tal modo que, incluso a la dosis más baja (1.25 μ M) la producción de ROS se inhibió en un 80.2 % (Fig. 12B y C).

Estos resultados corroboran los estudios previos, poniendo de manifiesto el potente efecto antioxidante que ejerce el CBD en queratinocitos, lo cual, es muy beneficioso en patologías de la piel donde el estrés oxidativo suele desencadenar un agravamiento de la sintomatología.

2.2 Análisis transcriptómico y proteómico del CBD sobre queratinocitos primarios

Con el objetivo de conocer los cambios moleculares que promueve el CBD, se llevó a cabo un estudio del proteoma y transcriptoma en queratinocitos humanos primarios. Para ello, las células se trataron con CBD a 10 μ M durante 24 h y se realizó la extracción de ARN y proteínas para su posterior análisis con las técnicas de RNAseq y SWATH, respectivamente (Fig. 13A).

En el análisis transcriptómico se observó que, de los 17571 genes identificados, 4860 genes estaban alterados con el tratamiento de CBD con respecto a los queratinocitos no tratados. A su vez, 2374 genes estaban regulados negativamente y 2486 positivamente (Fig. 13B). Por otro lado, el estudio del proteoma reveló que de las 2204 proteínas detectadas 724 sufrieron cambios significativos tras el tratamiento con CBD con respecto al control. De ellas, 520 proteínas presentaban reducida su expresión y 204 la tenían aumentada (Fig. 13C).

Finalmente, para traducir estos resultados a cambios funcionales, se realizó un análisis de sobreexpresión mostrando el incremento o disminución de los diferentes conjuntos de genes y proteínas utilizando EnrichR (Fig. 13D). Se observó que varias rutas moleculares relacionadas con la diferenciación de células epidérmicas, diferenciación de queratinocitos y desarrollo de la piel tenían su expresión aumentada. Lo mismo ocurría con los factores de transcripción MAFB y NRF2 (NFE2L2) y la ruta molecular de NRF2, lo que corrobora los efectos antioxidantes previamente descritos *in vitro*. Además, otros genes y proteínas relacionados con la organización de la matriz extracelular, el proceso metabólico del ADN y el ciclo celular se encontraron reducidos.

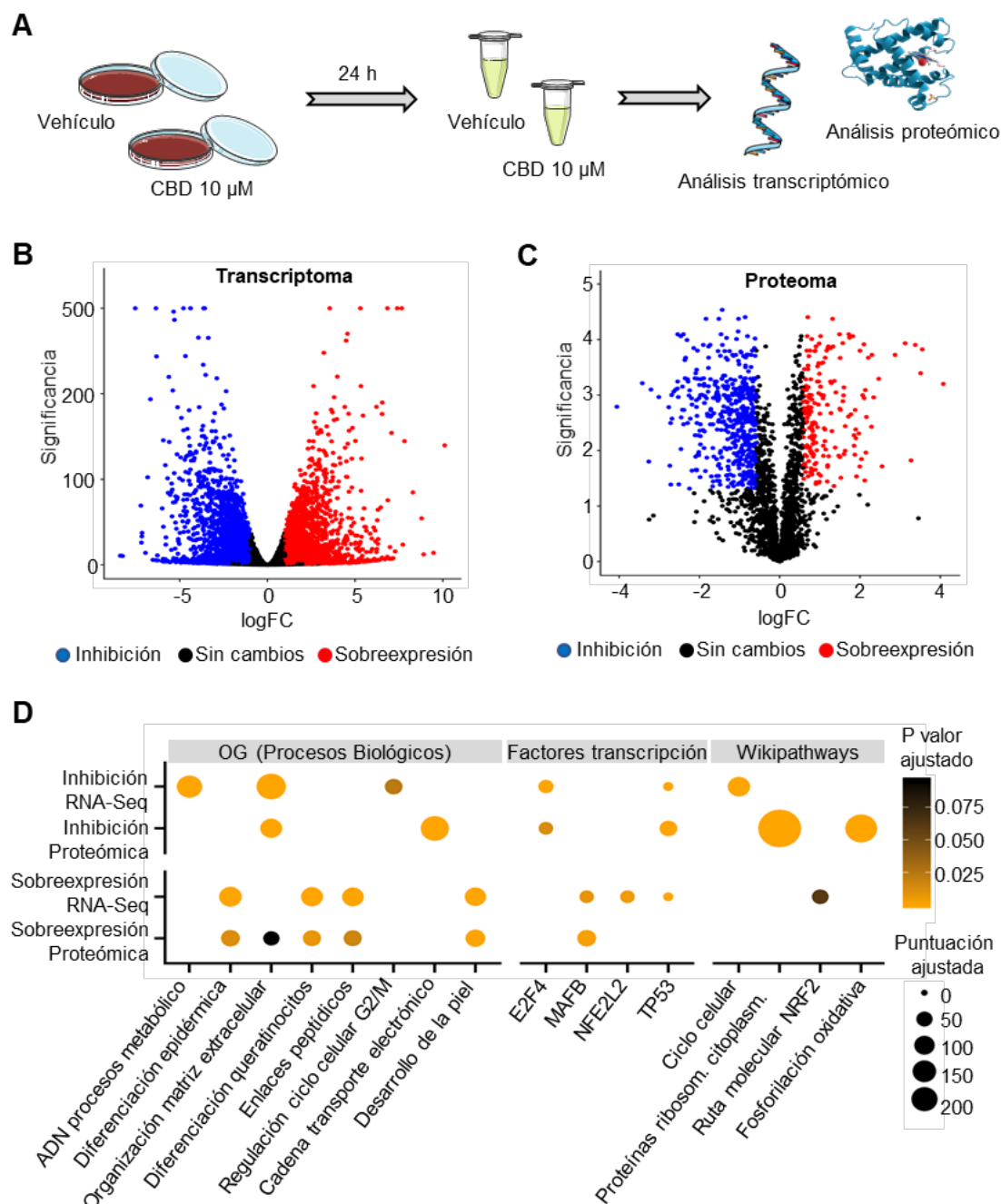


Figura 13. Análisis transcriptómico y proteómico de queratinocitos primarios tratados con CBD. A.

Esquema del proceso experimental donde las células fueron tratadas durante 24 h con CBD a 10 μ M o vehículo (control) para la extracción de ARN (RNA-seq) y proteína (SWATH). **B y C.** Volcano plot representando la dispersión de los datos resultantes de la secuenciación de ARN y del proteoma, respectivamente. Permiten observar la magnitud del cambio (cambios de inducción transformado en log2) con respecto a su significancia (transformado en log10). Cada punto representa un gen/proteína y el color representa aquellas que superaron un cambio absoluto > 2 veces de inducción y un p valor ajustado < 0.05. **D.** Análisis de sobreexpresión de genes y proteínas con las principales rutas alteradas tras del tratamiento con CBD. El proyecto de Ontología Genética (OG), los factores de transcripción JASPAR y los conjuntos de genes Wikipathways se emplearon para agrupar genes por categorías funcionales. La gráfica de puntos indica con un punto la sobrerepresentación significativa de un término dado (Prueba exacta de Fisher ajustada $P < 0.1$). Mientras que el color indica el valor de p ajustado del enriquecimiento y el tamaño del punto representa la puntuación combinada EnrichR.

En definitiva, a partir de los resultados transcriptómicos y proteómicos se puede concluir que el CBD promueve la proliferación y diferenciación de los queratinocitos. Además, coincidiendo con los datos observados en SimDerma, hay una clara activación del factor de transcripción y la ruta molecular de NRF2.

2.3 Efectos del CBD sobre la ruta molecular de NRF2

Analizando los cambios sobre la vía NRF2 observados en el análisis transcriptómico y proteómico en queratinocitos tratados con CBD con respecto a los no tratados, se observó una inducción muy destacada de SQSTM1 (también llamado p62) y HMOX1 (Fig. 14). Ambas proteínas desarrollan un papel de protección frente a estrés oxidativo, SQSTM1/p62 liberando a Nrf2 de Keap1 permitiendo su translocación al núcleo y HMOX1 liberando moléculas hemo (80).

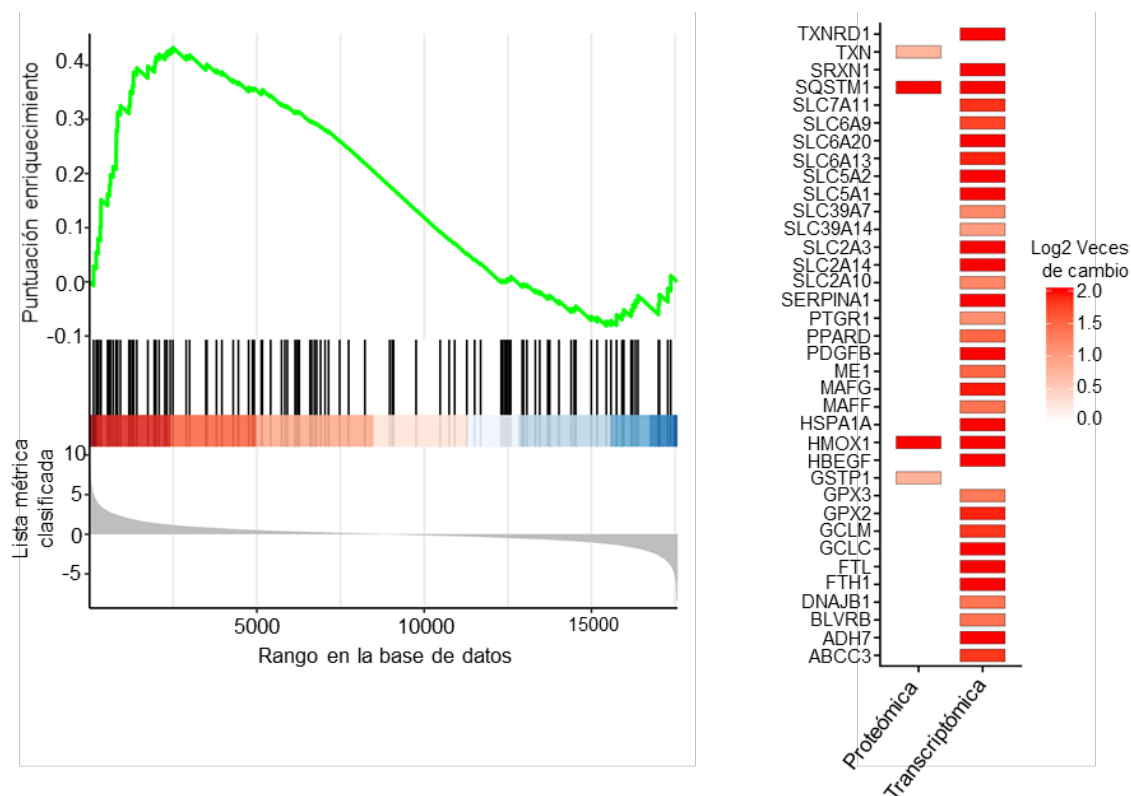


Figura 14. Cambios proteómicos y transcriptómicos causados por el CBD sobre la ruta molecular de NRF2. Posición de los genes que pertenecen a las vías de NRF2 ordenados por el cambio de veces de inducción (log2) cuya línea verde indica el puntaje de enriquecimiento continuo para el análisis del conjunto de genes (izquierda). Representación de la magnitud de las veces de cambio (log2) de genes y proteínas significativamente regulados al alza incluidos en esta vía de señalización (gráfica derecha).

A continuación, se quiso corroborar los resultados encontrados de SQSTM1 y HMOX en modelo *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar, como se observa en la figura 15A, se hizo un estudio cinético con CBD en queratinocitos (HaCaT) observándose que, a partir de las 12 h fue cuando el CBD (10 μ M) elevó los niveles de expresión de la

proteína SQSTM1/p62. El ensayo con diferentes dosis de CBD a 24 h, reveló que el CBD a 10 μ M es el que ejerció una mayor inducción de la expresión de dicha proteína (Fig. 15B). Paralelamente, se analizó la expresión de ARNm en queratinocitos primarios tratados con CBD observándose también una inducción de SQSTM1/p62 sobre las células no tratadas (Fig. 15C). Por último, se evaluó el efecto en los niveles de ARNm de SQSTM1/p62 en secciones de tejido de piel de ratones BALB/c después de haber sido sometidos a un tratamiento tópico con CBD (1 %) durante 5 días. Al igual que ocurría en los queratinocitos primarios, los niveles de ARNm de SQSTM1/p62 estaban incrementados con CBD con respecto a la piel no tratada (Fig. 15D).

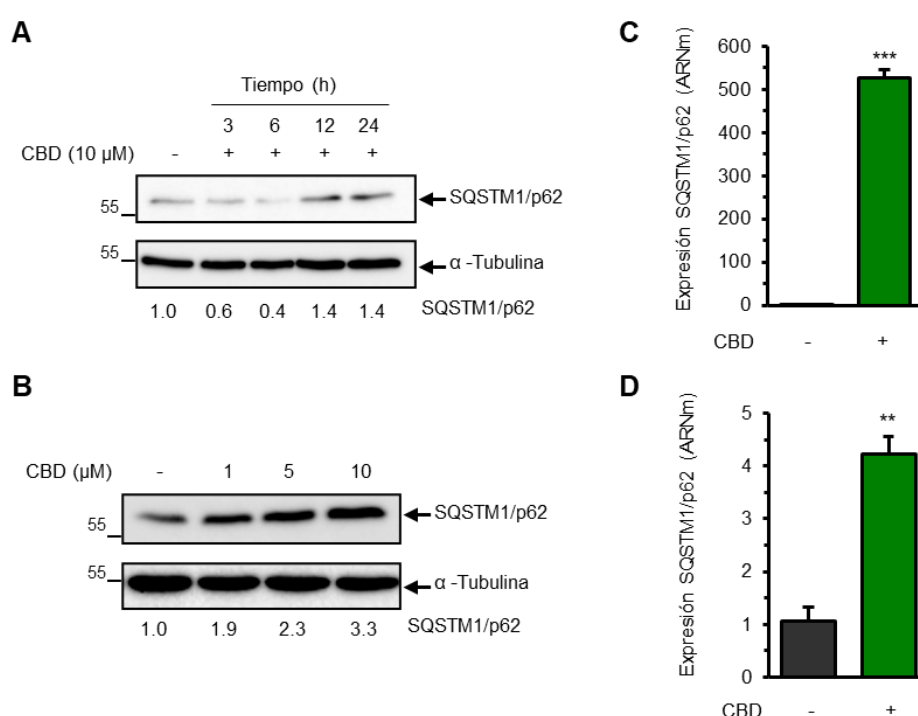


Figura 15. Efectos del CBD sobre la expresión SQSTM1/p62. **A.** Análisis cinético. **B.** Dosis-respuesta de la expresión de la proteína en HaCaT estimuladas durante 24 h con CBD por Western Blot. En ambos casos, la proteína α -Tubulina fue utilizada para la normalización y la cuantificación se realizó con el software ImageJ. **C.** Niveles de expresión de ARNm en queratinocitos primarios tratados con CBD (10 μ M) durante 24 h (n=3). **D.** Niveles de expresión de ARNm de secciones de piel de ratones BALB/c tratados con vehículo (n=3) o CBD al 1 % (n=6) durante 5 días. En ambos casos se analizó mediante RT-qPCR, representándose como expresión relativa de ARNm de la media de las réplicas \pm DE. **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el tratamiento con CBD y el control.

Por otro lado, para analizar el efecto de CBD sobre HMOX1 inicialmente se cuantificó el ARNm correspondiente a este gen en queratinocitos primarios, resultando en un incremento de sus niveles de expresión después del tratamiento con CBD a 10 μ M en comparación con los queratinocitos no tratados (Fig. 16A). Seguidamente, se analizó

también la expresión de ARNm de HMOX1 en secciones de piel de ratones BALB/c que recibieron la aplicación tópica de CBD (1 %) durante 5 días. Aunque sí hay una inducción con respecto a la piel no tratada, esta no es significativa (Fig. 16B). Sin embargo, en el análisis de inmunohistoquímica la inducción de HMOX1 fue muy evidente en la epidermis de los ratones después de los 5 días de tratamiento (Fig. 16C).

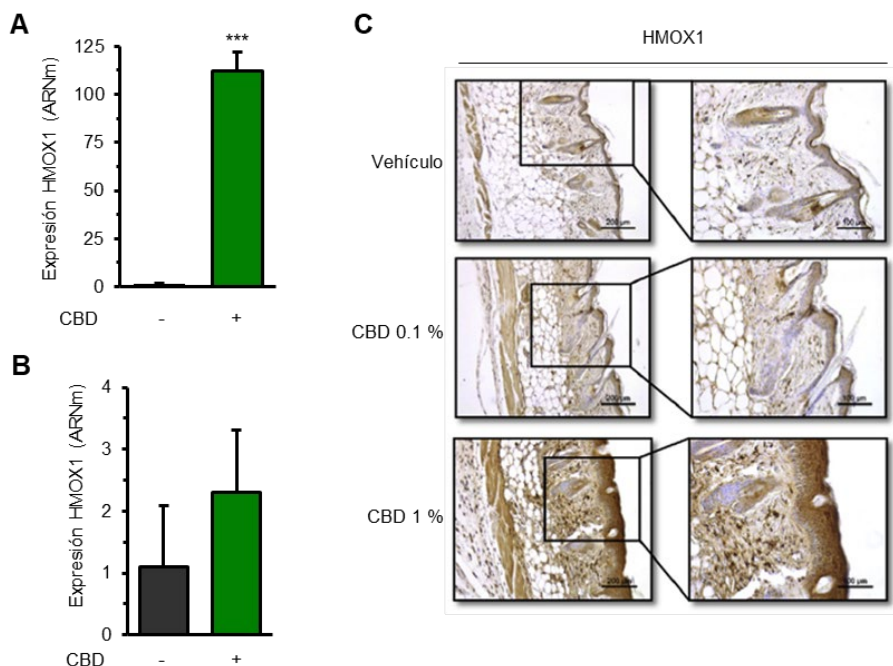


Figura 16. Incremento de la expresión de HMOX1 producida por CBD. **A.** Expresión de ARNm en queratinocitos primarios tratados con CBD (10 μ M) durante 24 h. **B.** Niveles de ARNm de secciones de piel de ratones BALB/c tratados con vehículo (n=3) o CBD al 1 % (n=6) durante 5 días. Ambas gráficas muestran la media \pm DE de la expresión relativa de ARNm de HMOX1 después del análisis mediante RT-qPCR. *** p <0.001 indica las diferencias significativas entre el tratamiento con CBD y el control. **C.** Inmunohistoquímica de HMOX1 de secciones de piel de ratones BALB/c tratados durante 5 días con vehículo, CBD a 0.1 % y al 1 %. Imágenes adquiridas con el microscopio Leica DM2000 con una amplificación de 4x (izquierda) y 10x (derecha).

El conjunto de estos resultados evidencia que, por un lado, los datos del análisis transcriptómico y proteómico coinciden con los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* y, por otro lado, que el CBD induce SQSTM1/p62 y HMOX1 los cuales son genes relacionados con la ruta de NRF2 protegiendo frente al estrés oxidativo.

2.4 Efecto del CBD sobre genes dependientes de la ruta de MAFB

Puesto que el factor de transcripción NRF2 heterodimeriza con las proteínas de la familia Maf para su unión a elementos de respuesta antioxidante en el ADN, se estudió el efecto que el CBD tenía sobre los genes y proteínas involucrados en la ruta molecular de esta familia. El hallazgo más significativo fue detectar que MAFB, gen implicado en la diferenciación epidérmica, se encontró inducido por CBD en los

ensayos de proteómica y transcriptómica (Fig. 13D) (185). Además, se encontraron 16 genes/proteínas relacionados con la ruta molecular de MafB que estaban inducidos por CBD, de entre ellos, destaca la citoqueratina 16 (KRT16 o CK16), la cual forma parte de los filamentos intermedios de los queratinocitos (Fig. 17).

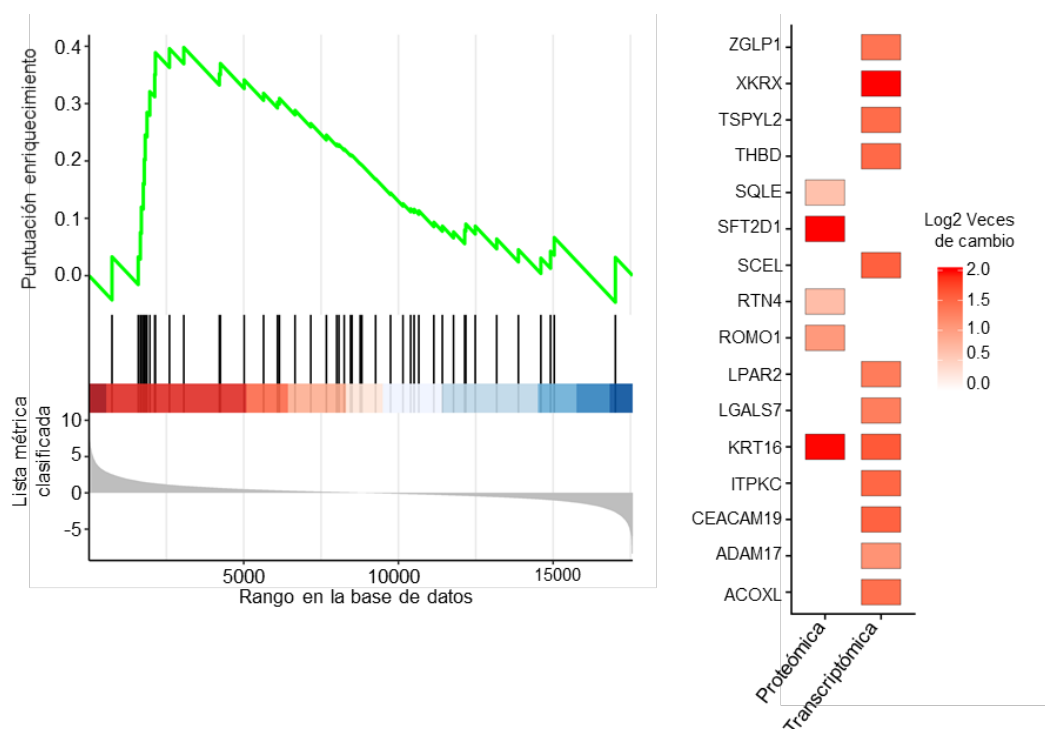


Figura 17. Análisis transcriptómico y proteómico del efecto del CBD sobre MAFB. Posición de los genes que pertenecen a las vías de MAFB ordenados por el cambio de veces de inducción (log2) cuya línea verde indica el puntaje de enriquecimiento continuo para el análisis del conjunto de genes (gráfica izquierda). Representación de la magnitud de las veces de cambio (log2) de genes y proteínas significativamente regulados al alza incluidos en esta vía de señalización (gráfica derecha).

Finalmente, se quiso determinar de manera *in vitro* e *in vivo* los efectos del CBD sobre la citoqueratina 16. En primer lugar, se evidenció que todas las dosis de CBD causaron un aumento de la expresión de dicha proteína en las células HaCaT a las 24 h (Fig. 18A). En segundo lugar, se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm para KRT16 en queratinocitos primarios tratados durante 24 h con CBD (10 μ M) y en piel del modelo animal tratados tópicamente con CBD al 1 % durante 5 días (Fig. 18B y C). En ambos casos, se observa un incremento de ARNm de citoqueratina 16 después del tratamiento con CBD con respecto al control, aunque en el caso de la piel no fue significativo. Por último, se observó un incremento de CK16 en la epidermis de ratones tratados con CBD como muestran las imágenes del estudio inmunohistoquímico, alcanzando un aumento mayor a la dosis de 1 % (Fig. 18D).

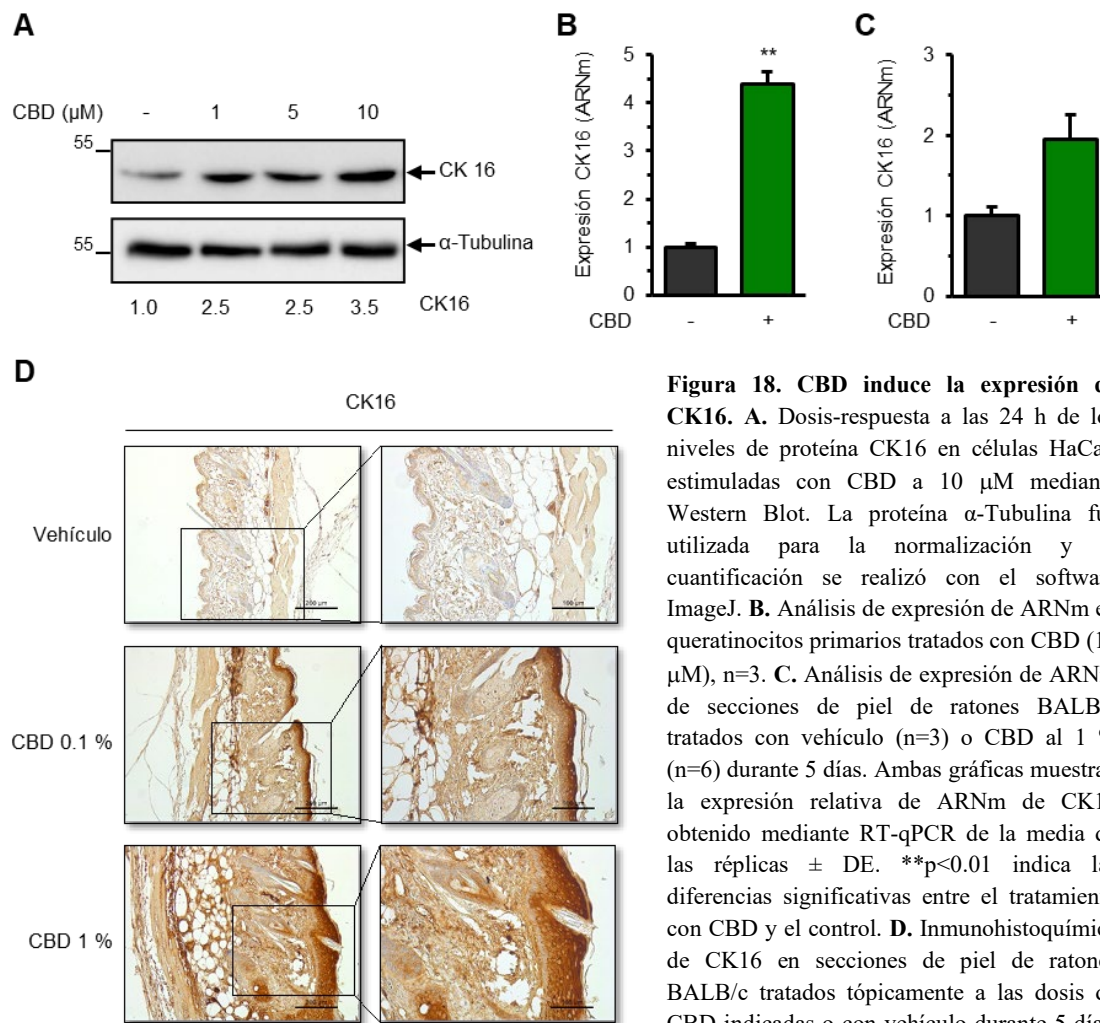


Figura 18. CBD induce la expresión de CK16. **A.** Dosis-respuesta a las 24 h de los niveles de proteína CK16 en células HaCaT estimuladas con CBD a 10 μM mediante Western Blot. La proteína α-Tubulina fue utilizada para la normalización y la cuantificación se realizó con el software ImageJ. **B.** Análisis de expresión de ARNm en queratinocitos primarios tratados con CBD (10 μM), n=3. **C.** Análisis de expresión de ARNm de secciones de piel de ratones BALB/c tratados con vehículo (n=3) o CBD al 1 % (n=6) durante 5 días. Ambas gráficas muestran la expresión relativa de ARNm de CK16 obtenido mediante RT-qPCR de la media de las réplicas ± DE. **p<0.01 indica las diferencias significativas entre el tratamiento con CBD y el control. **D.** Inmunohistoquímica de CK16 en secciones de piel de ratones BALB/c tratados tópicamente a las dosis de CBD indicadas o con vehículo durante 5 días. Imágenes adquiridas con el microscopio Leica DM2000 con una amplificación de 4x (izquierda) y 10x (derecha).

Por tanto, el CBD modula la expresión de proteína relacionadas con la ruta molecular de MAFB, destacando el efecto que promueve sobre la citoqueratina 16, la cual juega un importante papel en los queratinocitos a nivel estructural.

2.5 El CBD incrementa la proliferación y diferenciación epidérmica

Dado que el análisis funcional del CBD en transcriptómica y proteómica reveló que el tratamiento sobre queratinocitos primarios induce rutas moleculares de diferenciación epidérmica, se estudió los efectos del CBD sobre la piel de ratones a nivel morfológico.

En primer lugar, los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina muestran un claro incremento en el grosor de la epidermis de los ratones tratados con CBD con respecto a los tratados con vehículo (Fig. 19A). Adicionalmente, se evaluó el factor de proliferación celular Ki67, apreciándose un aumento de su expresión en el estrato basal de la epidermis de ratones

que habían sido tratados tópicamente con CBD como se puede comprobar en las imágenes de la figura 19B.

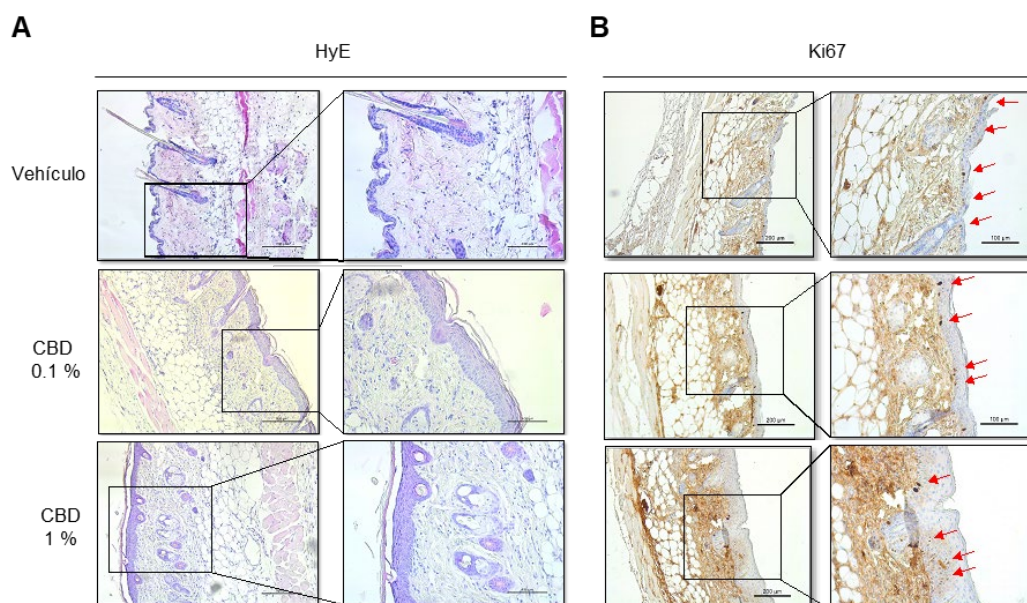


Figura 19. CBD induce diferenciación epidérmica en la piel de ratones BALB/c tratados tópicamente con CBD. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Leica DM2000 con una amplificación de 4x (izquierda) y 10x (derecha) correspondiente a cortes histológicos de piel de animales tratados con vehículo o CBD al 0.1 % y al 1 %. **A.** Tinción de hematoxilina-eosina. **B.** Inmunohistoquímica con Ki67.

En definitiva, nuestros resultados muestran que el CBD tiene un potente efecto antioxidante a través de la modulación de proteínas y genes relacionadas con la vía NRF2 y MAFB y, además, promueve cambios morfológicos en la piel que podrían mejorar la barrera epidérmica, haciendo que sea una molécula prometedora para el tratamiento de patologías dermatológicas.

3. Combinaciones basadas en CBD para el tratamiento de patologías de la piel

3. Combinaciones basadas en CBD para el tratamiento de patologías de la piel

Los datos obtenidos a partir de los estudios del efecto del CBD en proteómica y transcriptómica en queratinocitos primarios, junto con los resultados observados en los estudios histológicos en piel *in vivo* y las actividades biológicas en líneas celulares testadas en la plataforma SimDerma, postulan al CBD como un ingrediente prometedor para su uso tópico en patologías de la piel.

El objetivo siguiente fue desarrollar combinaciones con ingredientes naturales que incluyeran el CBD para su uso tópico, con el objetivo de paliar los síntomas derivados de la DA, acné e hiperpigmentación cutánea. Para ello, inicialmente se llevó a cabo el cribado de ingredientes testados en SimDerma con el fin de seleccionar aquellos que aporten actividades complementarias a las que presenta el CBD.

3.1 Estudio de los efectos de la combinación C-DA para su potencial aplicación en la dermatitis atópica

Como se ha explicado previamente, la DA es un desorden caracterizado por inflamación de la piel, disrupción de la barrera cutánea y prurito. Por este motivo, se seleccionaron una serie de dianas biológicas contempladas en la plataforma SimDerma que fueran de interés como tratamiento de la DA. Dicha selección consistió en la búsqueda de ingredientes con actividad antioxidante, antiinflamatoria, de restauración de barrera cutánea y antipruriginosa.

Desde el punto de vista experimental, para la selección de ingredientes candidatos de la plataforma de cribado SimDerma, se eligieron los ensayos de inhibición de la producción de ROS en queratinocitos y el ensayo DPPH para abarcar el problema del estrés oxidativo que se presenta en la DA derivado del contacto de la piel afectada con agentes irritantes, la exacerbada respuesta inmune y la peroxidación lipídica. Además, se seleccionó el ensayo anti-NF- κ B en fibroblastos, ya que este factor nuclear regula la activación de genes de citoquinas proinflamatorias implicadas en DA. En este mismo contexto, existe una relación entre el aumento de la inflamación con los bajos niveles de PPAR α , de tal modo que agonistas de PPAR α reducen la inflamación asociada a DA, por este motivo, el agonismo de PPAR α se introdujo como diana molecular para incluir en la búsqueda de ingredientes para la combinación de DA. PPAR α también desempeña un papel importante en la regulación de la barrera epidérmica que se encuentra dañada en pacientes con DA. En este mismo sentido, se

incluyó la búsqueda de inductores de FLG cuyos niveles se encuentran disminuidos en áreas de tejidos afectadas con esta patología. Por último, incluido en la plataforma de cribado, se escogió el análisis de la actividad de TRPV-1 para buscar antagonistas de este receptor, con el objetivo de paliar el prurito asociado a DA.

Una vez seleccionadas las dianas moleculares, se eligieron aquellos ingredientes que, a las dosis más bajas presentan una actividad potente. La combinación resultante para la DA se denominó C-DA (Tabla 6).

	Requisitos C-DA				
	Antioxidante	Anti NF- κ B	Agonista PPAR α	Antagonista TRPV-1	Inductor FLG
SC277		✓			✓
SC200	✓			✓	
Cannabidiol	✓				
SC155			✓		

Tabla 6. Selección de ingredientes según su actividad como candidatos para la combinación C-DA frente a la DA.

- Ingredientes que componen la combinación C-DA

SC277 es extracto de bulbo de la planta del narciso de manojo (*Narcissus tazetta*). Sobre él, ya se ha reportado que presenta actividad antioxidante, cicatrizante e inductor de la proliferación (186, 187). Basándose en los resultados de SimDerma, fue seleccionado fundamentalmente por ser un potente inductor de la transcripción del gen de la FLG presentándose entre los 10 mejores ingredientes testados en dicha plataforma con una inducción de 4 veces sobre el control. Entre esta primera selección de ingredientes, se eligió finalmente por presentar la mayor actividad a la dosis más baja testada (1/1000) siendo esto relevante para evitar la citotoxicidad celular en la combinación final. Adicionalmente, se demostró que presenta actividad antiinflamatoria causada por la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B.

El SC200 es un ingrediente extraído de la corteza del tallo del árbol *Uncaria tomentosa* comúnmente conocido como “uña de gato”. Estudios previos han demostrado que este extracto tiene capacidad antiinflamatoria, antimicrobina y antioxidante (188-190). No obstante, la principal actividad por la que fue elegido para formar parte de C-DA, fue por ser antagonista de TRPV-1, cuya actividad no ha sido descrita previamente, pero sí validada en SimDerma. Los datos mostraron que el SC200 revirtió al 100 % el efecto agonista de la capsaicina manteniéndose ese efecto a la dosis más baja a la que fue testado (1/1000). Además, aunque el SC200 no fue capaz de reducir ROS, mostró

una actividad antioxidante superior al 60% en el ensayo de DPPH también a la dosis más baja testada (1/1000).

SC155 es un activo extraído de los brotes de la alcaparra, *Capparis spinosa*. Sobre él, hay estudios que demuestran su actividad antiinflamatoria, antioxidante o antifúngica (191, 192). La inclusión de este extracto en C-DA se basó en su capacidad agonista de PPAR α , siendo el tercer extracto con más actividad debido a que la dosis de 1/100 indujo 54 veces sobre la inducción de PPAR α en comparación con el control sin tratar.

Una vez seleccionados los ingredientes de la plataforma SimDerma, se testaron individualmente con el objetivo de elegir aquellas dosis más bajas que mantuvieran la actividad para las que habían sido seleccionados. En la tabla 7 se indican las 4 dosis finales seleccionadas para cada ingrediente, asociándose la dosis C-DA.1 a la más concentrada y C-DA.4 a la menos concentrada.

	Estado del ingrediente	Dosis C-DA			
		C-DA.1	C-DA.2	C-DA.3	C-DA.4
SC277	Líquido	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
SC200	Líquido	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000
Cannabidiol (μ M)	Sólido	2.5	1.25	0.625	0.312
SC155	Líquido	1/500	1/1000	1/2000	1/4000

Tabla 7. Dosis de cada ingrediente empleada para la combinación C-DA.

3.1.1 C-DA presenta actividad antioxidante y reduce los niveles de ROS en queratinocitos

Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante del CBD que se había demostrado en los ensayos previos, se quiso comprobar si al combinarlo con los demás ingredientes (SC277, SC200 y SC155) esa actividad se mantenía o si por el contrario se vería afectada por interferencia con alguno de ellos.

Para ello, en primer lugar, se realizó el ensayo acelular de DPPH. Como se observa en la figura 20, C-DA redujo significativamente un 17.3 % la actividad oxidante del DPPH a la dosis C-DA.1 y en un 15.9 % a la dosis C-DA.2. En este ensayo, el CBD de manera individual no mostraba actividad antioxidante previa y se siguió comportando de este modo. Por el contrario, el SC200 presentó una actividad

antioxidante del 15.4 % a la dosis de 1/2000. Inesperadamente, SC277 presentó una actividad antioxidante del 21.9 % de inhibición de oxidación a la dosis más elevada (1/800).

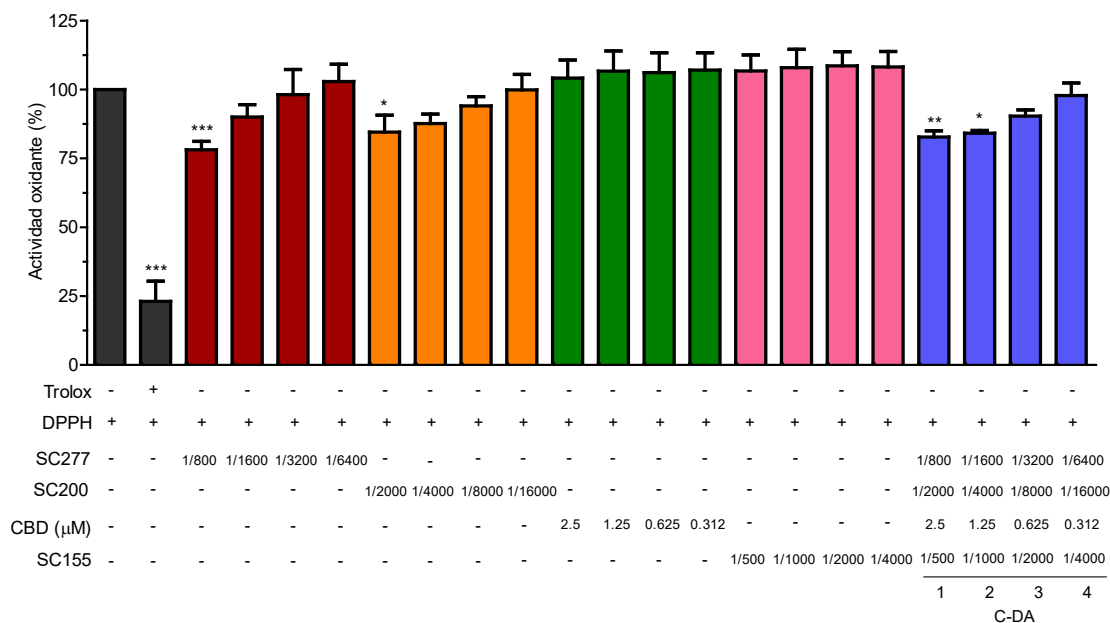


Figura 20. Efecto antioxidante de C-DA. Modelo acelular basado en la reacción del radical libre estable DPPH (0.125 mM) con los ingredientes por separado y en combinación. Como control de inhibición de oxidación del experimento se utilizó Trolox (0.2 mM). La actividad antioxidante (%) se midió como absorbancia a 517 nm después de 30 min en oscuridad. Los datos muestran la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes y están expresados como porcentaje de actividad oxidante, considerando los valores de DPPH como el 100 % de actividad. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el DPPH y las muestras de los ingredientes y C-DA

A continuación, se analizó la capacidad de reducción de ROS en queratinocitos, los resultados mostraron que las concentraciones más altas, C-DA.1 y C-DA.2, fueron más eficaces inhibiendo la producción de ROS un 44.2 % y un 42.9 % respectivamente, mientras que C-DA.3 lo hizo en un 28.6 % y C-DA.4 en un 34.6 %. Cabe destacar que, aunque el SC200 y el SC155 no presentaron una actividad significativa en la producción de ROS, el SC277 inhibió la producción de ROS en todas sus dosis en torno a un 40 % y el CBD mostró su mayor inhibición a 2.5 μ M (56.7 %) (Fig. 21A y B).

Por lo tanto, la combinación C-DA tiene capacidad antioxidante sugiriendo un papel en la reducción del estrés oxidativo de la región de piel afectada por DA.

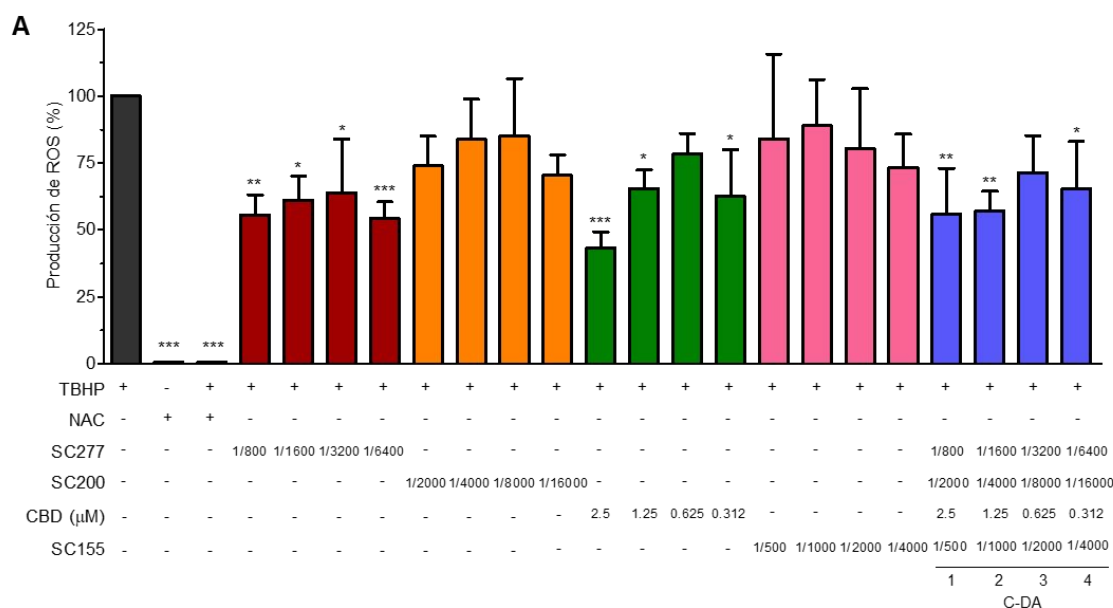


Figura 21. C-DA reduce los niveles de ROS en queratinocitos. Las células HaCaT fueron tratadas con los ingredientes por separado a las dosis correspondientes o bien en combinación. Transcurridos 20 min se añadió TBHP (400 μM) incubando durante 3 h. Como inhibidor de oxidación se utilizó NAC (15 mM). La fluorescencia generada por la sonda H2DCFDA (2 μM) se evaluó al IncuCyte ZOOM. **A.** Representación gráfica de los niveles de ROS expresado en porcentaje de producción incluyendo la media ± DE de al menos 3 experimentos independientes considerando los valores del TBHP como el 100 % de la producción de ROS. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el TBHP y los ingredientes y C-DA. **B.** Imágenes representativas adquiridas por IncuCyte ZOOM (objetivo 4x) para cada dosis de C-DA en comparación con el control de inducción de ROS (TBHP).

3.1.2 C-DA es capaz de inhibir la transcripción de NF-κB inducida por TNF-α en fibroblastos

Para paliar la inflamación que se origina durante la DA, se analizó si C-DA era capaz de reducir la transcripción de NF-κB inducida por TNF-α.

Como se observa en la figura 22, C-DA.1 inhibe la transcripción de NF-κB en un 54.4 % con respecto al control positivo de inducción (TNF-α) mientras que el porcentaje desciende al 32.9 % a la dosis C-DA.2. Las dosis más bajas de la

combinación, así como el tratamiento individual con el SC200 y con el CBD son negativos para este parámetro. En cambio, SC277 sí mostró una inhibición clara de la activación de NF- κ B a 1/800 y 1/1600 (50.7 y 31.2 %, respectivamente). Estos resultados evidencian que la combinación C-DA tiene actividad antiinflamatoria inhibiendo los niveles de NF- κ B y por tanto, podría modular la expresión de citoquinas proinflamatorias que se encuentran aumentadas en DA.

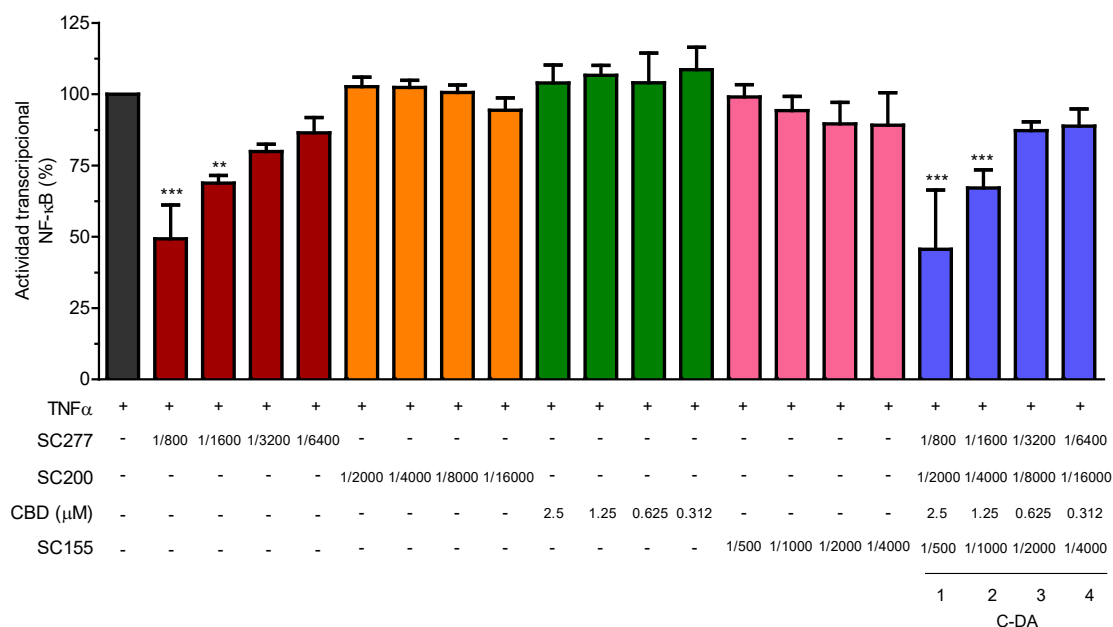


Figura 22. Efecto antiinflamatorio de C-DA. Las células NIH3T3-KBF-Luc fueron preincubadas con los ingredientes por separado o en combinación a las dosis determinadas durante 20 min. A continuación, se añade TNF- α (30 ng/ml) como inductor de NF- κ B y se incuba durante 6 h, midiendo la luminiscencia (RLU) con el lector Berthold TriStar2. Es representado como la media del porcentaje de actividad transcripcional de NF- κ B \pm DE obtenida de al menos 3 experimentos, asignando el valor del 100 % de actividad al TNF- α . **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el TNF- α y los tratamientos.

3.1.3 C-DA actúa como agonista de PPAR α

Se buscó que C-DA fuera capaz de activar PPAR α para reducir la inflamación producida en las lesiones de DA. Después de 6 h de tratamiento con los ingredientes individuales y con la combinación C-DA, se elucidó que la dosis más alta de C-DA inducía la actividad de PPAR α en 4.4 veces con respecto al control, mientras que el resto de las dosis también mostraban inducción, pero mucho más atenuada. Entre los ingredientes individuales, sólo SC155 demostró actividad agonista para PPAR α alcanzando 6.9 veces de inducción con respecto al control a la dosis de 1/500, mientras que el tratamiento de las células con el resto de las dosis provocaba inducciones mayores a 2 veces con respecto a las células no tratadas (Fig. 23).

Este resultado sugiere que la actividad agonista de PPAR α en la combinación C-DA es aportada por el ingrediente SC155, y esta podría reducir la inflamación en las lesiones asociadas a la DA después de su aplicación tópica sobre esas áreas.

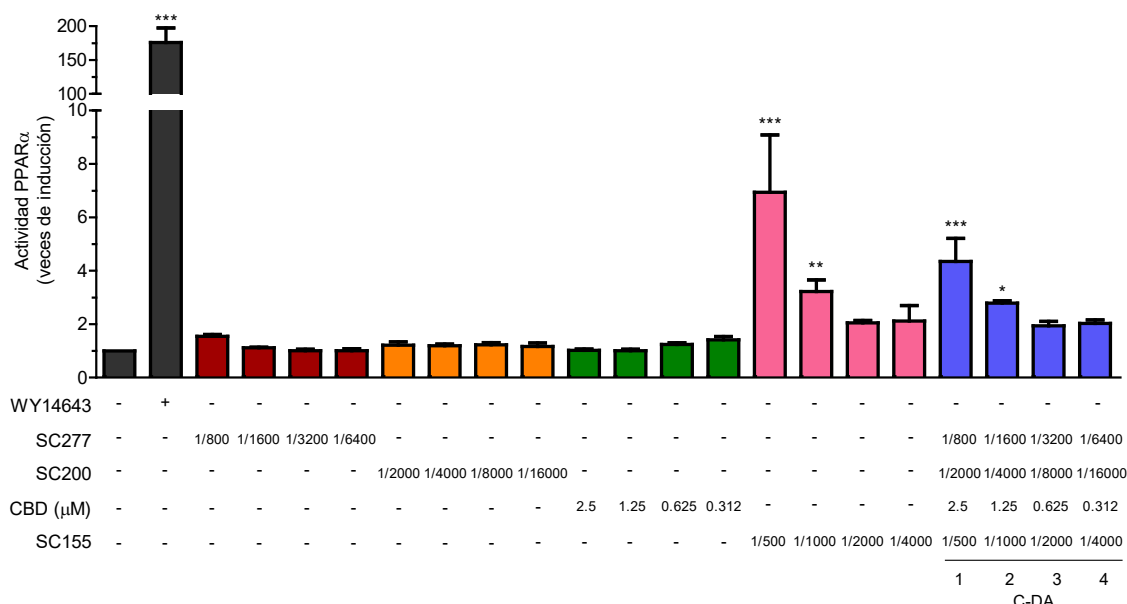


Figura 23. Efecto de C-DA sobre el receptor PPAR α . Las células 293T fueron transfectadas con los plásmidos PPAR α y Gal4-Luc con PEI. Fueron estimuladas con los ingredientes a las dosis indicadas empleando el agonista de PPAR α WY14643 (5 μ M) como control. Pasadas 6 h de incubación, las células se lisaron y se midieron por luminiscencia (RLU) con el lector Berthold TriStar2. La actividad transcripcional de PPAR α se expresa en veces de inducción sobre el control de la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre las células sin tratar y los ingredientes.

3.1.4 Actividad antagonista para TRPV-1 de la combinación C-DA

La activación de TRPV-1 está asociada al picor, siendo el síntoma principal y más oneroso de la DA. Además, estudios previos han demostrado que antagonistas de TRPV-1 mejoran los daños de la barrera epidérmica (193). Por consiguiente, se buscó que la combinación C-DA tuviera capacidad antagonista para TRPV-1 con el fin de disminuir los síntomas previamente descritos.

Para evaluar el antagonismo de TRPV-1, las células que fueron tratadas con capsaicina mostraron una disminución de la viabilidad provocada por la alteración de la membrana plasmática debido a la entrada de Ca^{2+} . La capsazepina, un antagonista de TRPV-1, impide que se produzca dicha citotoxicidad manteniendo la viabilidad a niveles similares al de las células no tratadas.

En este contexto, C-DA se comporta del mismo modo que la capsazepina recuperando la viabilidad de las células en todas sus dosis empleadas. Dicha actividad viene dada por el SC277, puesto que de forma individual se comporta del mismo modo, es decir, elevando la viabilidad celular en torno al 100 %. El resto de los ingredientes no fueron capaces de revertir el efecto de la capsaicina por lo que no se comportan como

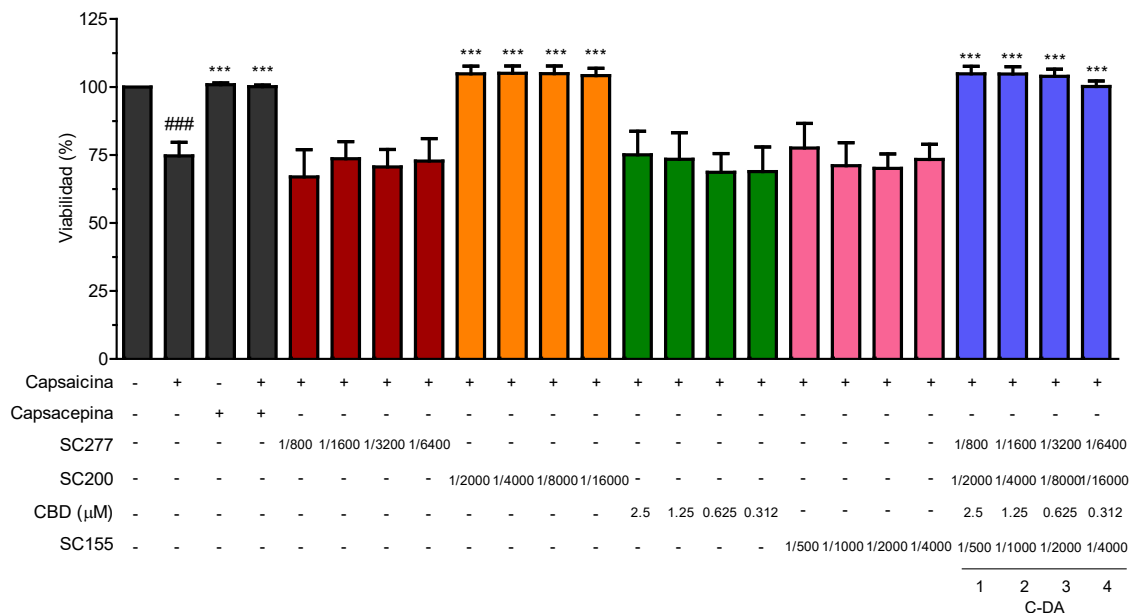


Figura 24. C-DA ejerce actividad antagonista sobre TRPV-1. Las células 293T-VR1 fueron tratadas con los controles de antagonismo de TRPV-1 (Capsazepina 10 μM) y agonismo (Capsaicina 1 μM) y las muestras a las dosis indicadas, en medio con YOYO-1 (0.1 μM). La fluorescencia fue medida después de 3 horas utilizando el equipo IncuCyte ZOOM y se normalizó la citotoxicidad añadiendo tritón X-100 (0.0625 %). Se representa como el porcentaje de viabilidad normalizado a partir de la fluorescencia de la media ± DE de al menos 3 experimentos independientes. ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el tratamiento con Capsaicina y los ingredientes y C-DA. ###p<0.001 muestra las diferencias significativas entre células no tratadas y el tratamiento con Capsaicina.

antagonistas de TRPV-1 (Fig. 24).

Por tanto, la presencia del extracto de narciso (SC277) aporta a la fórmula C-DA un efecto de antagonismo de TRPV-1 que podría mejorar el prurito asociado a la DA.

3.1.5 C-DA induce la transcripción del gen de la FLG en queratinocitos

La FLG mantiene la homeostasis en la barrera cutánea y es una proteína que se ve disminuida en las zonas de la piel afectada por DA. Por lo que, se persiguió que la combinación C-DA tuviese un efecto inductor sobre esta diana biológica.

Para ello, los queratinocitos fueron tratados con los ingredientes y la combinación a las diferentes dosis durante 72 h. La figura 25 muestra como C-DA.1 ejerce una inducción de 11.8 veces sobre las células no tratadas, y manteniendo una

actividad inductora de FLG de 6.7 veces a la dosis C-DA.2. Entre los ingredientes individuales, cabe destacar la actividad de SC277 que presenta 12.1 veces de inducción a la dosis de 1/800, 4.41 veces a la dosis 1/1600 y 2.38 veces a la dosis 1/3200. El resto de los ingredientes no ejercen inducción sobre la transcripción de la FLG (Fig. 25).

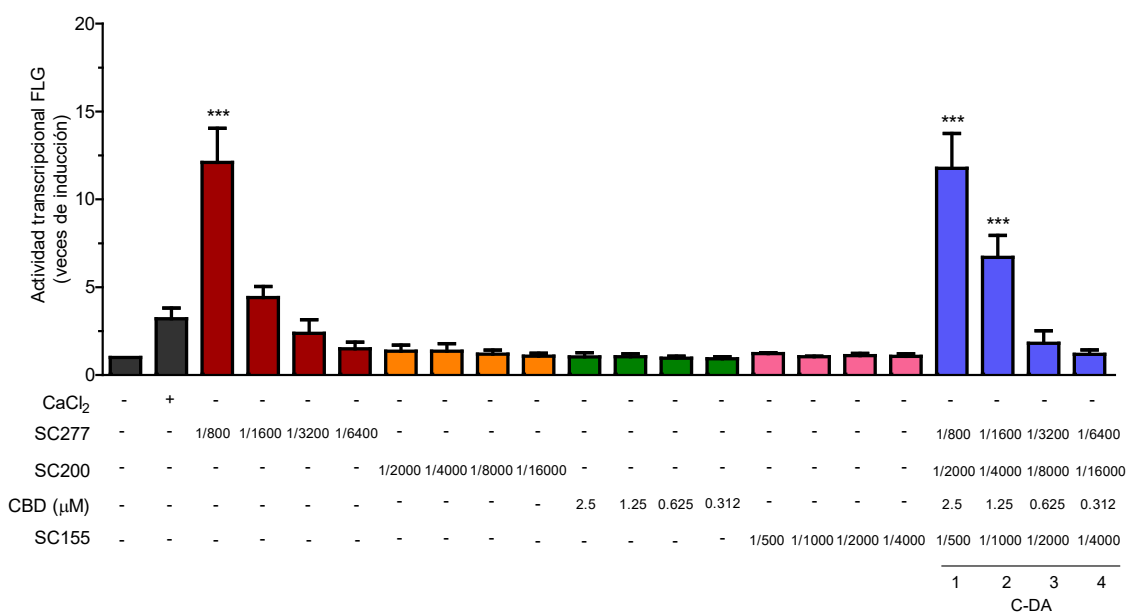


Figura 25. C-DA activa la transcripción del gen de la FLG en queratinocitos. Las células HaCaT-FLG-Luc fueron estimuladas con las dosis indicadas de los ingredientes y de C-DA. Como inductor de FLG se empleó el CaCl₂ (1.2 mM) incubándose durante 72 h. Los resultados se normalizaron con la lectura de proteínas mediante el método Bradford. La actividad transcripcional de FLG fue evaluada midiendo la luminiscencia (RLU) con el lector Berthold TriStar2. La actividad transcripcional de la FLG se expresa en veces de inducción sobre el control de la media \pm DE de 3 al menos experimentos independientes. *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el control (células no tratadas) y los ingredientes.

A tenor de los resultados obtenidos, se observa que el ingrediente SC277 es el que aporta la actividad inductora de FLG a la combinación. La presencia de este efecto hace que C-DA sea un buen candidato como tratamiento tópico de la DA al mejorar el estado de la barrera epidérmica causada por los bajos niveles de FLG asociadas a mutaciones genéticas u otras causas.

3.2 Efectos de C-AC para su potencial aplicación en acné

El acné es una patología de carácter inflamatorio cuya causa es una desregulación en la producción y composición del sebo. Esto desencadena en una serie de efectos como inflamación del área afectada, aumento del estrés oxidativo a consecuencia de la peroxidación de los lípidos que forman el sebo e infección bacteriana por parte de *P. acnes*. Considerando estos efectos, se realizó la combinación contra el acné, se seleccionaron de la plataforma de SimDerma los experimentos de

DPPH, inhibición de ROS, anti-NF- κ B e inductor de HIF-1 α . Este último caso, fue seleccionado debido a que en la plataforma SimDerma no hay ningún experimento que aborde la actividad antimicrobiana como tal, pero se ha demostrado que HIF-1 α en queratinocitos colabora en la respuesta inmune innata, estando relacionada con la expresión de proteínas pro-inflamatorias y NF- κ B (194, 195). Por otro lado, se seleccionó el ensayo de cicatrización para ayudar a reducir el tiempo de curación de las heridas derivadas de los comedones formados en el acné.

Siguiendo la misma metodología que para la combinación anterior, una vez seleccionadas las dianas moleculares se escogieron los ingredientes que presentaban una actividad más potente a la dosis más baja. La combinación de ingredientes resultantes para el tratamiento de los síntomas del acné se muestra en la tabla 8 y se denominó C-AC.

	Requisitos C-AC			
	Antioxidante	Anti-NF- κ B	Inductor HIF-1 α	Cicatrización
SC285	✓	✓	✓	
SC185				✓
Cannabidiol	✓			

Tabla 8. Selección de ingredientes según su actividad como candidatos para la combinación C-AC frente al acné.

- Ingredientes que componen la combinación C-AC

SC285 es un extracto procedente de las hojas verdes de la planta del té, *Camellia sinensis*. Este extracto tiene un alto porcentaje del compuesto epigallocatequina galato sobre el cual existen estudios previos que describen su actividad fotoprotectora, cicatrizante, antioxidante y antiinflamatoria (196, 197). Los resultados obtenidos para esta diana en la plataforma de SimDerma demuestran que el ingrediente SC285 a la dosis de 100 μ g/ml induce 16.2 veces los niveles de transcripción de HIF-1 α en queratinocitos con respecto a las células sin tratar, siendo el tercer ingrediente con mejor actividad de los 386 testados para este experimento. A esta misma dosis, SC285 inhibió ROS al 100 % demostrando su potente actividad antioxidante e inhibió la transcripción de NF- κ B en torno a un 50 % aportando actividad antiinflamatoria. En su conjunto, convirtió al ingrediente SC285 en esencial para el desarrollo de la combinación C-AC.

El ingrediente SC185 es extraído de la planta *Panax ginseng* la cual ha sido utilizada en la medicina natural desde la antigüedad. Varios estudios demuestran que su

principal componente son los ginsenoides los cuales presentan actividad antioxidante, inmunomoduladora, blanqueante y de restauración de la membrana cornificada (198-200). La principal causa de su selección para formar parte de la combinación C-AC, fue su capacidad de cicatrización en queratinocitos observada en los resultados de la plataforma SimDerma, alcanzando un porcentaje superior al 50 % de cierre de la herida con 48 h de tratamiento.

	Estado del ingrediente	Dosis C-AC			
		C-AC.1	C-AC.2	C-AC.3	C-AC.4
SC285 (µg/ml)	Sólido	100	80	64	51.2
SC185 (µg/ml)	Sólido	125	100	80	64
Cannabidiol (µM)	Sólido	2.5	2	1.6	1.28

Tabla 9. Dosis de cada ingrediente empleada para la combinación C-AC.

Cabe destacar, que siguiendo el mismo criterio que para otras combinaciones, se seleccionaron las dosis más bajas de cada ingrediente que respetara la actividad para las que habían sido seleccionados. Las dosis elegidas para cada ingrediente se representan en la tabla 9.

3.2.1 La combinación C-AC muestra capacidad antioxidante e inhibitoria de ROS en queratinocitos

Para acompañar a la actividad antioxidante descrita previamente del CBD, se analizó el efecto que tenía cuando se mezclaba en combinación con los ingredientes SC285 y SC185.

Con el objetivo de dilucidar dicha actividad, en primer lugar, se realizó el ensayo de DPPH. La combinación C-AC fue capaz de revertir el efecto oxidante del DPPH a todas sus dosis, superando el 60 % de inhibición. Del mismo modo, el ingrediente SC285 inhibe más del 60 % en todas sus dosis, siendo valores próximos a los del Trolox (control positivo de antioxidación). Como se esperaba, ni el CBD ni el SC185 fueron capaces de revertir la actividad oxidante del DPPH de forma individual (Fig. 26). Teniendo en cuenta estos resultados, es el SC285 quien aporta el efecto antioxidante sobre DPPH en la combinación C-AC.

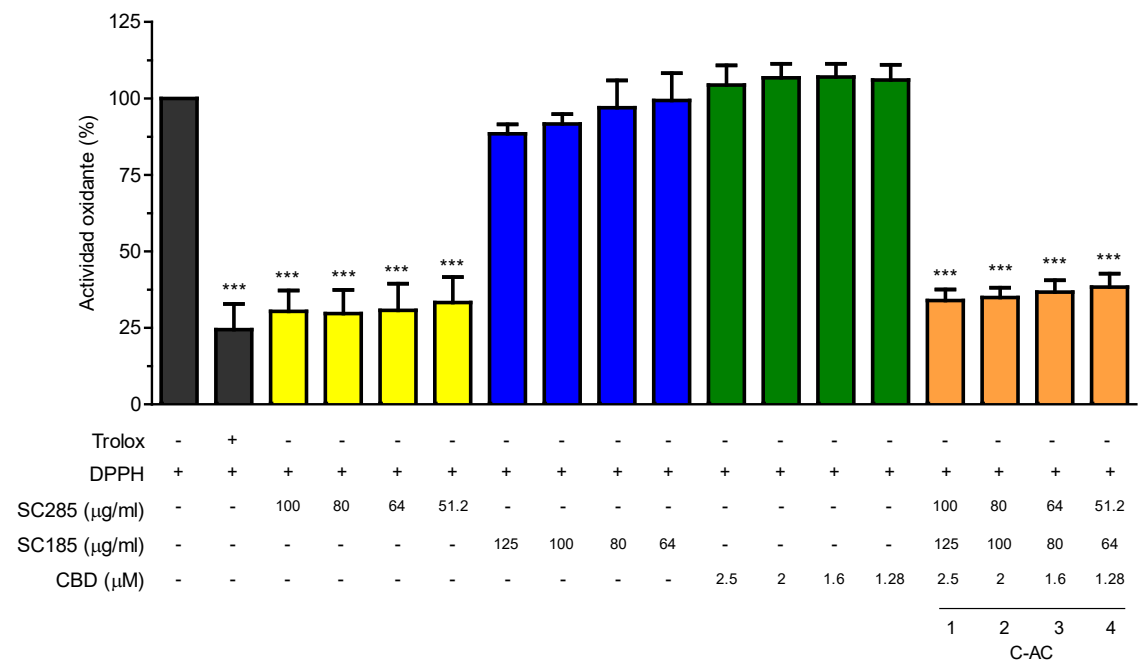


Figura 26. C-AC inhibe la oxidación ejercida por DPPH. Modelo acelular basado en la reacción de oxidación del radical libre estable DPPH (0.125 mM). El Trolox (0.2 mM) fue utilizado como control antioxidante del experimento. Los ingredientes que constituyen la combinación C-AC fueron testados por separado y en combinación, incubándose durante 30 min. La absorbancia fue cuantificada a 517 nm. Los datos muestran la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes y están expresados como porcentaje de actividad oxidante, considerando los valores de DPPH como el 100 % de actividad. *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el DPPH y los ingredientes o la combinación C-AC.

Posteriormente, se observó que la combinación C-AC tenía una alta capacidad de inhibir ROS a todas las dosis después de 3 h de tratamiento. De este mismo modo se comportó el ingrediente SC285, alcanzando la disminución máxima de ROS producido por TBHP. En cambio, el CBD, mostró una significativa reducción de ROS del 65.0 % a la dosis más elevada (2.5 μ M) siendo su menor actividad a 1.28 μ M con un 51.6 % de inhibición. Por el contrario, el ingrediente SC185 no presentó actividad inhibitoria frente a ROS (Fig. 27).

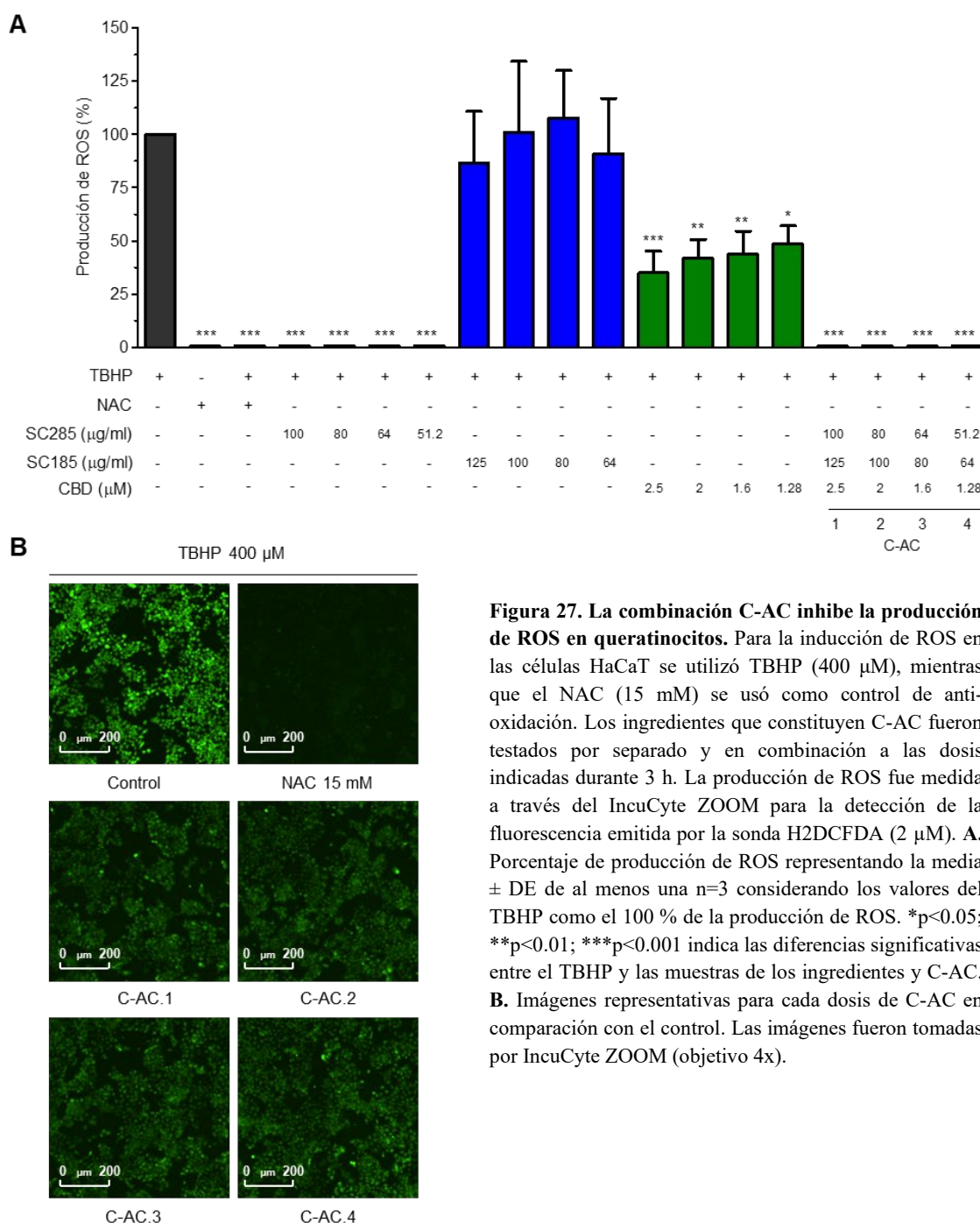


Figura 27. La combinación C-AC inhibe la producción de ROS en queratinocitos. Para la inducción de ROS en las células HaCaT se utilizó TBHP (400 μM), mientras que el NAC (15 mM) se usó como control de anti-oxidación. Los ingredientes que constituyen C-AC fueron testados por separado y en combinación a las dosis indicadas durante 3 h. La producción de ROS fue medida a través del IncuCyte ZOOM para la detección de la fluorescencia emitida por la sonda H2DCFDA (2 μM). **A.** Porcentaje de producción de ROS representando la media ± DE de al menos una n=3 considerando los valores del TBHP como el 100 % de la producción de ROS. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el TBHP y las muestras de los ingredientes y C-AC. **B.** Imágenes representativas para cada dosis de C-AC en comparación con el control. Las imágenes fueron tomadas por IncuCyte ZOOM (objetivo 4x).

3.2.2 El tratamiento con C-AC reduce la transcripción de NF-κB inducida por TNF-α en fibroblastos

El carácter inflamatorio del acné se debe a niveles elevados del factor de transcripción NF-κB como causa principal de la infección por *P. acnes*. Por ende, se pretendió que la combinación C-AC inhibiera la activación de esta ruta molecular. Para ello, se evaluó la actividad transcripcional de NF-κB en fibroblastos mediante luminiscencia. La figura 28 muestra que con la dosis de la combinación C-AC.1 hay

una inhibición del 73.3 % y con la dosis C-AC.2 es de un 65.9 %. Aunque con las dosis restantes hay una tendencia de inhibición, los resultados no son significativos estadísticamente. Individualmente, el ingrediente SC285 también muestra una inhibición de la transcripción de NF- κ B del 61.7 % y 50.5 % a las dosis de 100 μ g/ml y 80 μ g/ml, respectivamente. Contrariamente, los ingredientes SC185 y CBD no mostraron actividad inhibitoria en este ensayo.

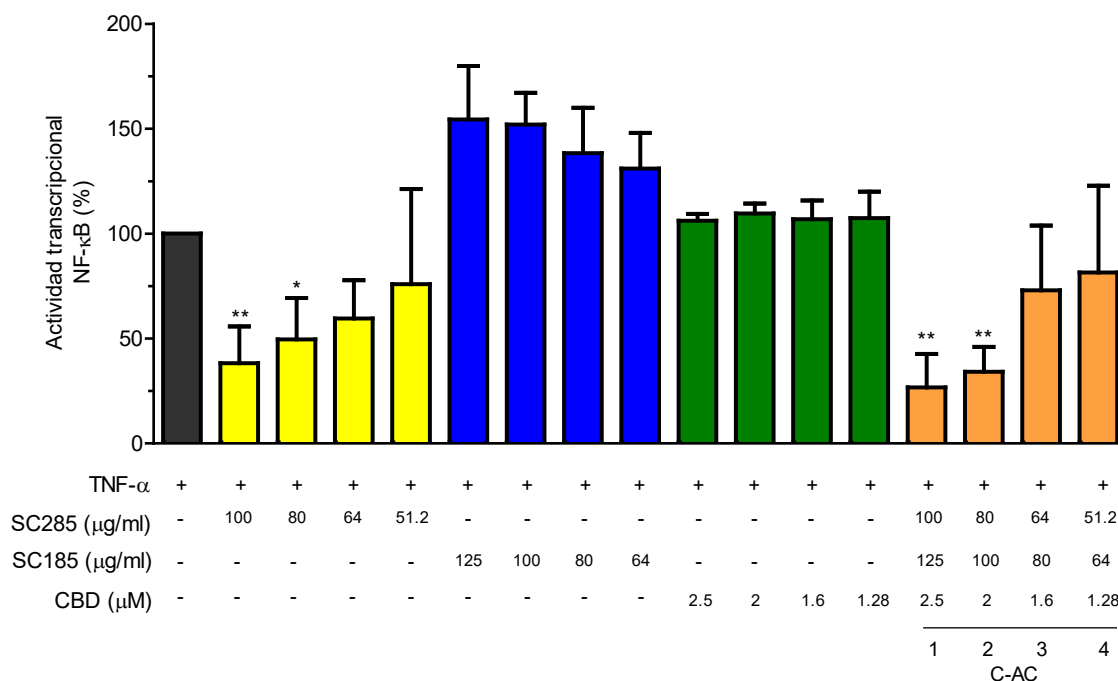


Figura 28. C-AC reduce la inflamación a través de la inhibición de la transcripción de NF- κ B. NIH3T3-KBF-Luc fueron preincubadas con las dosis indicadas de los ingredientes por separado o en combinación durante 20 min. La activación de NF- κ B fue inducida al añadir TNF- α (30ng/ml) e incubar durante 6 h. La actividad transcripcional fue medida como luminiscencia (RLU) utilizando el lector Berthold TriStar2. Datos expresados como la media del porcentaje de actividad transcripcional de NF- κ B \pm DE obtenida de al menos 3 experimentos, asignando el valor del 100 % de actividad a los valores alcanzados por el TNF- α . * p <0.05; ** p <0.01 indica las diferencias significativas entre el TNF- α y los ingredientes o la combinación C-AC.

A priori, se concluye que es el SC285 quien le está aportando la actividad anti-NF- κ B a la combinación C-AC, convirtiendo a esta combinación como un posible tratamiento para la reducción del componente antiinflamatorio asociado al acné.

3.2.3 C-AC induce HIF-1 α en queratinocitos favoreciendo la respuesta inmune

HIF-1 α participa en la respuesta inmune de la piel a través de citoquinas que controlan la función pro-inflamatoria y la producción de péptidos antimicrobianos (126, 201). Teniendo en cuenta esto, se planteó que inductores de HIF-1 α reforzarían la protección inmunitaria a la combinación C-AC.

La actividad transcripcional de HIF-1 α está inducida por la combinación C-AC a todas sus dosis, alcanzando 14.4 veces de inducción con el tratamiento de la dosis más alta de la combinación (C-AC.1) sobre el control de células no tratadas, con las dosis C-AC.2 y C-AC.3 las veces de inducción fueron 12.9 y 9.8, respectivamente. En cuanto a la actividad de los ingredientes por separado, como se observa en la figura 29, sólo el SC285 fue capaz de inducir la actividad transcripcional de HIF-1 α a todas sus dosis, alcanzando la inducción máxima de 23.1 veces sobre las células no tratadas (a la dosis de 80 μ g/ml) y una inducción mínima de 11.3 veces con la dosis más baja testada (51.2 μ g/ml).

Por lo tanto, ya que ningún otro ingrediente presenta actividad inductora sobre HIF-1 α , se puede concluir que es el ingrediente SC285 quien le está otorgando dicha actividad a la combinación C-AC para la aplicación sobre lesiones de acné.

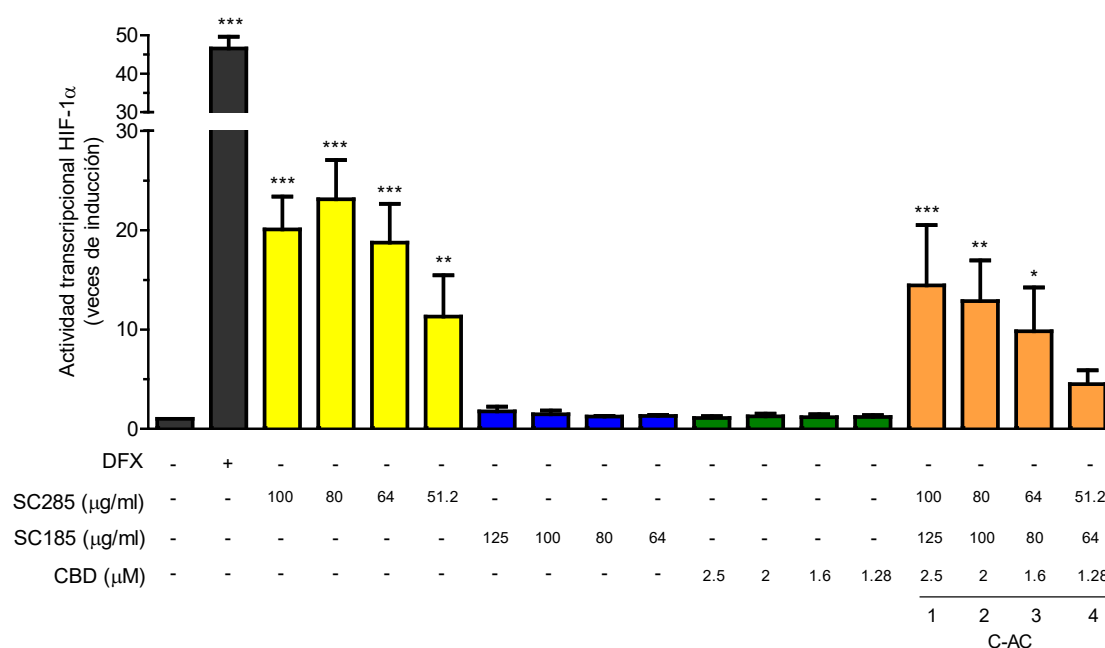


Figura 29. Inducción de HIF-1 α causado por el tratamiento con la combinación C-AC. HaCaT-EPO-Luc fueron tratadas con los ingredientes por separado y en combinación durante 6 h. DFX (150 μ M) fue empleado como inductor de HIF-1 α . La luminiscencia (RLU) fue medida por el lector Berthold TriStar2 cuyos resultados fueron representados como la media de la actividad transcripcional de HIF-1 α \pm DE, n=3. Actividad expresada en veces de inducción sobre las células sin tratar. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el control y los tratamientos restantes

3.2.4 El extracto de *Panax ginseng* actúa como cicatrizante en queratinocitos

El objetivo de buscar un ingrediente que mejorara la cicatrización fue restaurar las lesiones dérmicas que aparecen en el acné. En el ensayo de cicatrización se observó que el extracto SC185 fomentaba la cicatrización en queratinocitos al haber un 71.85 %

de confluencia en la herida a 48 h a la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en las células sin tratar es de un 9.8 % y el tratamiento con el control positivo (FBS) alcanzaba el 97.8 % de confluencia. En cambio, este efecto no se percibe en la combinación C-AC a ninguna de sus dosis obteniéndose valores con porcentajes similares a los de las células sin tratar (Fig. 30).

Por tanto, no se puede concluir que la combinación C-AC mejore la cicatrización a pesar de contener el ingrediente de SimDerma con mayor actividad para los ensayos de cicatrización de heridas en queratinocitos.

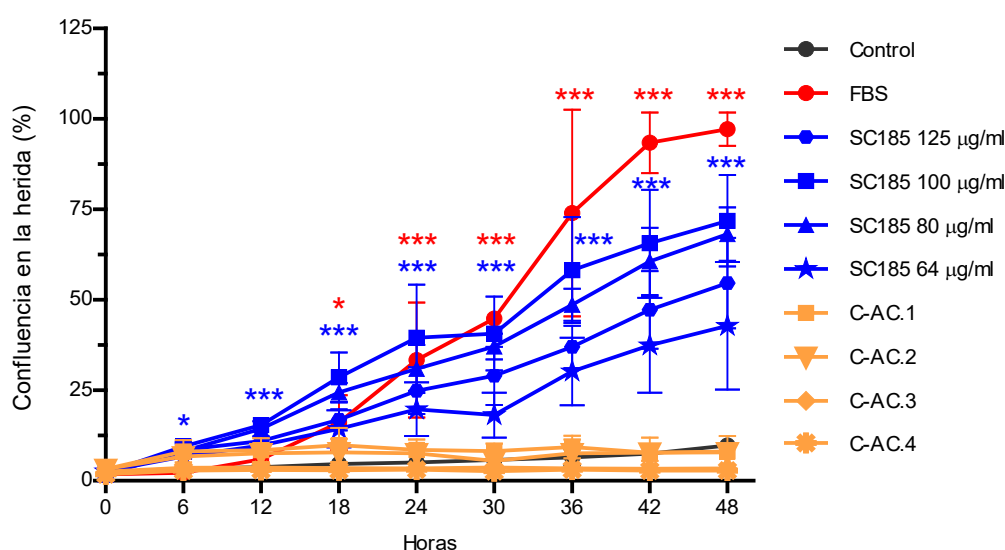


Figura 30. SC185 induce cicatrización en queratinocitos, pero C-AC no mantiene esta actividad. Se realizó la herida en la monocapa de células HaCaT con el dispositivo Wound Maker y, posteriormente, se estimuló las células en medio sin FBS con la combinación C-AC y con el ingrediente SC185. El FBS fue utilizado como inductor de cicatrización. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas por el IncuCyte ZOOM cada 3 h durante 48 h. Representación de la media del porcentaje de confluencia de 3 experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre las células no tratadas y los tratamientos.

3.2.5 CBD inhibe el crecimiento de *P. acnes*, mientras que la combinación C-AC reduce los efectos derivados de la infección por *P. acnes* al inhibir la actividad de la enzima hialuronidasa

Dado que durante el desarrollo del acné tiene un rol fundamental la infección con *P. acnes*, se quiso evaluar la actividad antimicrobiana del CBD sobre esta bacteria. Como se observa en la tabla de la figura 31A, el CBD tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3.1 μM , mientras que después de incubar durante 7 horas se determinó que la concentración mínima bactericida (CMB) es superior a 25 μM , es decir, que para observarse una disminución del 99.9 % de las unidades formadoras de

colonias (UFC) se necesitaría aplicar una dosis de CBD superior a 25 μM (dosis más alta testada).

A

Cepa probada	CMI del CBD (μM)	CMB del CBD (μM)	
		Incubación 2-3 h	Incubación 6-7 h
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	3.1	>25	>25

B

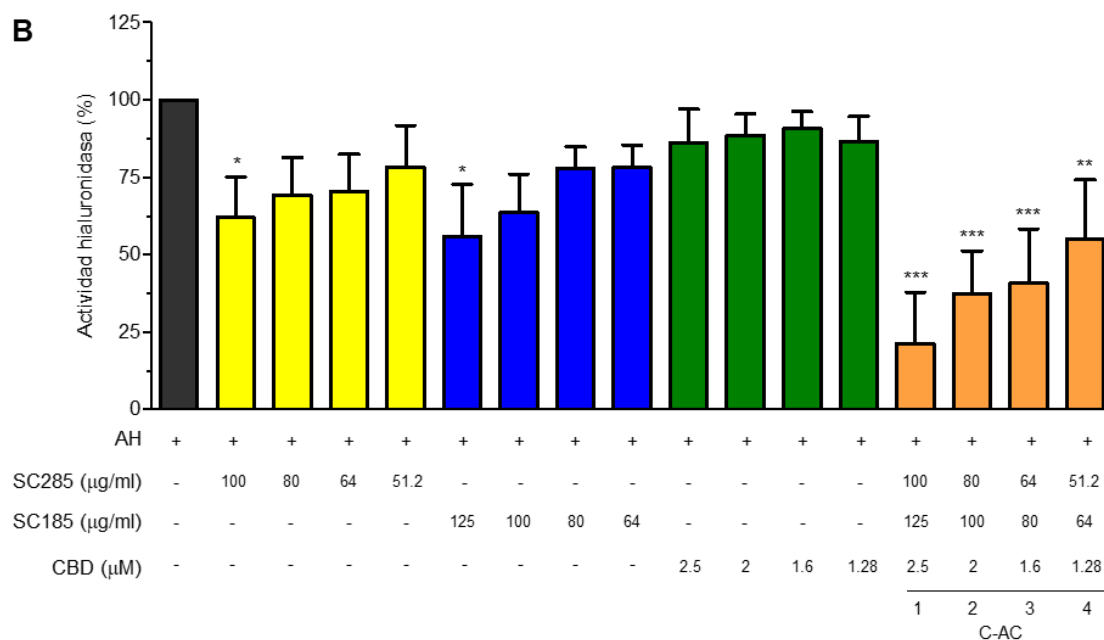


Figura 31. Actividades para la neutralización del efecto de *P. acnes*. **A.** CMI es calculada después del análisis de la turbidez de pocillos inoculados con *P. acnes* y con diferentes dosis de CBD. CMB es calculado como la concentración de CBD a la que debe inhibir el número de UFC en un 99.9 % después de 6-7 h de incubación. **B.** Mezcla de la enzima hialuronidasa con las diferentes dosis de ingredientes de manera individual o en combinación. Después de 10 min, se añadió 0.3 % de ácido hialurónico (AH). Tras la incubación durante 45 min, se mezcló con una solución de albúmina ácida durante 10 min. La absorbancia fue medida a 600 nm. El porcentaje de la actividad hialuronidasa fue calculado teniendo en cuenta el coeficiente de extinción (14.84) y el factor de dilución (1.33) de la enzima, representando la media del porcentaje de actividad de la enzima \pm DE obtenida de 3 experimentos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el control el AH con respecto a los ingredientes y la combinación C-AC.

Previamente, se ha descrito que *P. acnes* expresa la enzima hialuronidasa, la cual degrada el ácido hialurónico, un componente esencial de la matriz extracelular que permite la fluidez y lubricación de las uniones dérmicas (127). Por este motivo, la actividad de dicha enzima fue evaluada. La figura 31B muestra que la combinación C-AC es capaz de inhibir la actividad enzimática de manera dosis-dependiente, alcanzando una inhibición de la hialuronidasa del 67.5 % a la dosis más alta (C-AC.1), un 62.7 % con C-AC.2, una inhibición del 59.1 % por el tratamiento con C-AC.3 y un 45.0 % con C-AC.4. En cambio, cuando se testaron los ingredientes individualmente, se observó

que sólo el ingrediente SC285 (100 µg/ml) y SC185 (125 µg/ml) mostraban inhibición significativa de la actividad enzimática siendo de 37.9 % y 44.2 % respectivamente.

Cabe destacar, que la combinación de ingredientes con finalidad antiacné muestra una inhibición de hialuronidasa muy potente puesto que ninguno de los ingredientes por sí solos tienen una inhibición tan evidente. Por tanto, la combinación C-AC podría ser una buena opción terapéutica para su uso tópico en las lesiones de acné con el fin de reducir la degradación de ácido hialurónico por parte de *P. acnes*.

3.3 La combinación C-HP inhibe la hiperpigmentación de la piel

Los trastornos hiperpigmentarios se desencadenan por alteraciones en la síntesis o acumulación de melanina. Esta es la razón, por la cual se seleccionaron una batería de experimentos de la plataforma de cribado SimDerma que incluyen el estudio de rutas moleculares relacionadas con el proceso de melanogénesis.

Teniendo en cuenta lo anterior, se eligieron los ensayos de inhibición de la producción de melanina y la inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa, la cual es la principal enzima implicada en la síntesis de melanina. Además, debido a que la radiación UV induce la producción de ROS y, por tanto, las células responden aumentando la producción de melanina para disminuir ese estrés oxidativo ocasionado, es fundamental la búsqueda de ingredientes que disminuyan la inducción de ROS. Por último, se seleccionó el ensayo de autofagia para el cribado de ingredientes, ya que hay estudios que demuestran que desempeña un papel relevante en el control de la melanogénesis y la regulación de los melanosomas.

El método de selección de los ingredientes fue el mismo que se empleó para las combinaciones anteriores (C-DA y C-AC). De tal modo que, se eligieron aquellos ingredientes que a dosis más bajas presentaban una actividad potente. La combinación resultante para el tratamiento de las alteraciones hiperpigmentarias se denominó C-HP (Tabla 10).

	Requisitos C-HP			
	Actividad tirosinasa	Producción de melanina	Antioxidante	Autofagia
SC161	✓	✓	✓	✓
Cannabidiol			✓	
SC502			✓	✓

Tabla 10. Selección de ingredientes según su actividad como candidatos para la combinación C-HP frente a la hiperpigmentación.

- Ingredientes integrantes de la combinación C-HP

SC161 es un extracto de la planta de *Coriandrum sativa*, comúnmente conocida como cilantro o perejil chino. Estudios previos demuestran que el extracto de coriander tiene un efecto protector frente a la radiación UV, disminuyendo ROS y la inflamación (202-204). Además, también se ha estudiado el carácter antimicrobiano del aceite puro extraído de esta planta (205). Analizando los resultados obtenidos para este extracto en la plataforma SimDerma, se observó que el SC161 es uno de los ingrediente más potentes, siendo capaz de inhibir la enzima tirosinasa en un 89.1 % y la producción de melanina en un 69.6 % a dosis bajas (1/1000). Este extracto destaca también por ser capaz de inhibir la producción de ROS en queratinocitos e inducir autofagia muy ligeramente (2.3 %).

El ingrediente SC502 es un extracto aislado de la corteza del árbol *Pinus radiata*. Previamente se ha descrito su actividad antioxidante y antialérgica promovido por su alto contenido en polifenoles (206, 207). Los resultados obtenidos en SimDerma muestran que, a la dosis de 1/1000, posee una potente inducción del proceso de autofagia (100 %) y corrobora su poder antioxidante al encontrarse una inhibición de la producción de ROS superior al 50 %.

Como se muestra en la tabla 11, se seleccionaron las dosis indicadas para la combinación C-HP, concretamente, 3 dosis que de la más concentrada a la menos, se denominaron C-HP.1, C-HP.2 y C-HP.3.

	Estado del ingrediente	Dosis C-HP		
		C-HP.1	C-HP.2	C-HP.3
SC161	Líquido	1/2000	1/4000	1/8000
Cannabidiol (µM)	Sólido	2.5	1.25	0.625
SC502	Líquido	1/2000	1/4000	1/8000

Tabla 11. Dosis de cada ingrediente empleada para la combinación C-HP.

3.3.1 C-HP disminuye la producción de melanina e inhibe la tirosinasa

La disminución de la melanina puede ser causada por la regulación negativa de la melanogénesis a diferentes niveles de la ruta molecular. En primer lugar, se determinó el contenido de melanina en melanocitos B16. Como inductor de melanogénesis se empleó el IBMX, y se estudió el efecto que causaba el tratamiento con los ingredientes por separado y en combinación a dos dosis (C-HP.2 y C-HP.3). Los

resultados mostraron como los ingredientes de manera individual no mostraban una disminución significativa en la producción de melanina, en cambio, el tratamiento con C-HP.2 generó una reducción de la melanina del 54.2 %, siendo incluso superior a la que presentaba el ácido kójico (AK) (Fig. 32A).

A continuación, se analizó el efecto que tenían los ingredientes de manera independiente y en combinación sobre la actividad de la enzima tirosinasa en melanocitos a los que se había inducido la melanogénesis con IBMX (Fig. 32B). De manera similar a lo que se observó en la producción de melanina, ninguno de los 3

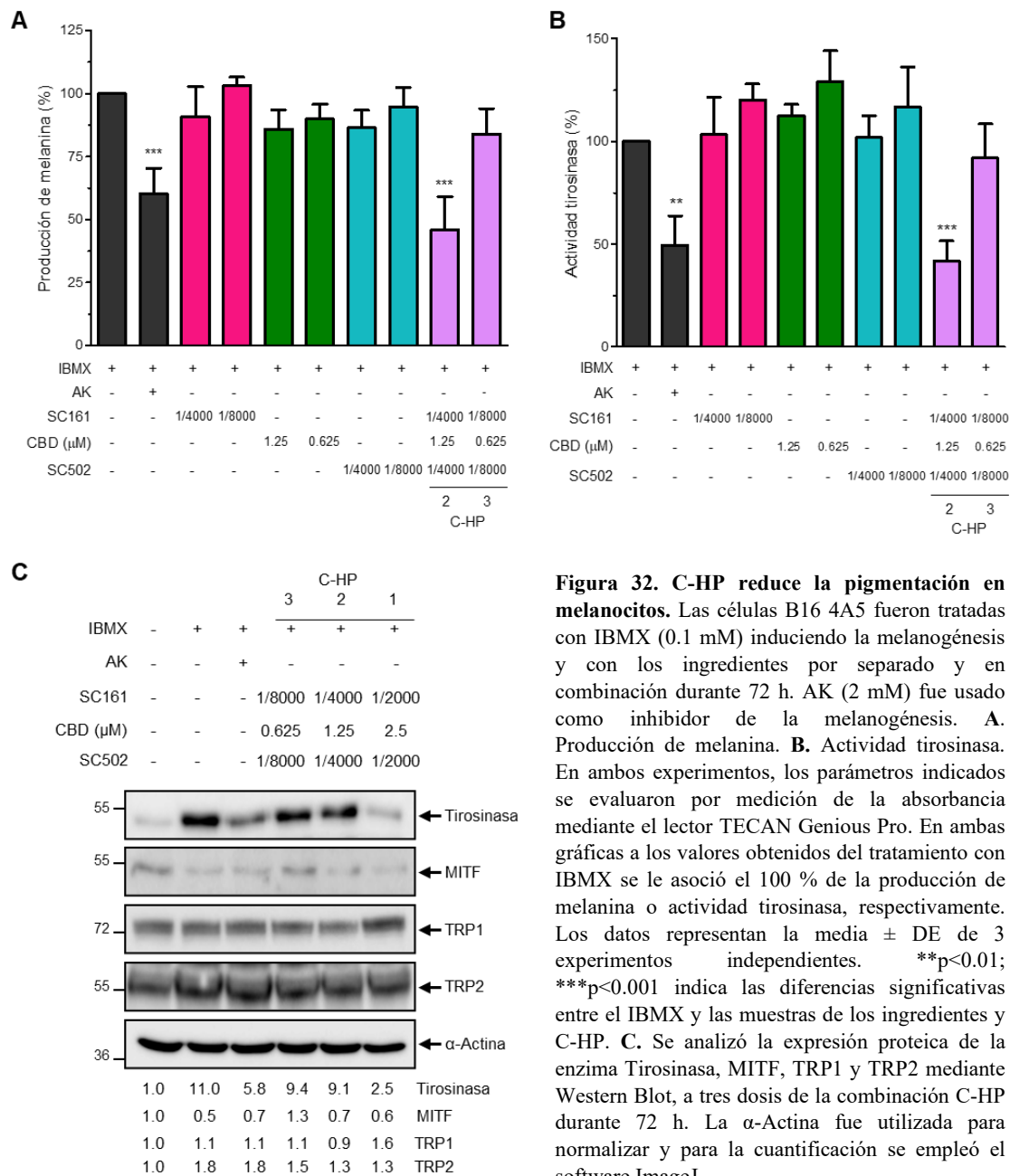


Figura 32. C-HP reduce la pigmentación en melanocitos. Las células B16 4A5 fueron tratadas con IBMX (0.1 mM) induciendo la melanogénesis y con los ingredientes por separado y en combinación durante 72 h. AK (2 mM) fue usado como inhibidor de la melanogénesis. **A.** Producción de melanina. **B.** Actividad tirosinasa. En ambos experimentos, los parámetros indicados se evaluaron por medición de la absorbancia mediante el lector TECAN Genius Pro. En ambas gráficas a los valores obtenidos del tratamiento con IBMX se le asoció el 100 % de la producción de melanina o actividad tirosinasa, respectivamente. Los datos representan la media ± DE de 3 experimentos independientes. **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el IBMX y las muestras de los ingredientes y C-HP. **C.** Se analizó la expresión proteica de la enzima Tirosinasa, MITF, TRP1 y TRP2 mediante Western Blot, a tres dosis de la combinación C-HP durante 72 h. La α-Actina fue utilizada para normalizar y para la cuantificación se empleó el software ImageJ.

ingredientes producía inhibición de la actividad de la enzima de forma individual, sin embargo, sí se observaba una inhibición del 58.2% cuando se combinaban entre ellos a la dosis más alta (C-HP.2).

Por último, se decidió cuantificar los niveles de expresión de proteínas clave en el proceso de melanogénesis tras el tratamiento con la combinación C-HP. Como se muestra en la figura 32C, todas las dosis de la combinación provocaron la inhibición de la expresión de la enzima tirosinasa, siendo muy acusada a la dosis más concentrada (C-HP.1). Por el contrario, no se observaron cambios significativos sobre la expresión de las proteínas MITF, TRP1 o TRP2 las cuales también participan en el proceso de melanogénesis.

Por tanto, la disminución de la producción de melanina que ejerce C-HP parece estar mediada por la inhibición de la enzima tirosinasa lo que conlleva a una reducción de la síntesis de melanina.

3.3.2 C-HP es capaz de inhibir el estrés oxidativo en queratinocitos

Basándonos en el hecho de que las ROS favorecen la melanogénesis, se analizó el efecto que tenían los ingredientes por sí solos y en combinación sobre la producción de ROS. Al igual que ocurría en las combinaciones anteriores para DA y acné, el CBD presentó una potente inhibición de ROS, alcanzando unos valores de 82.6 y 40.2 % a la dosis de 1.25 y 0.625 μ M, respectivamente. Por el contrario, SC161 y SC502, presentaron inhibición de la producción de ROS, pero en ambos casos no fue significativa. Cabe destacar, que con la combinación C-HP, por el contrario, mostró una potente reducción de ROS, al inhibir su producción en torno al 80 % tanto la concentración C-HP.2 como la C-HP.3 (Fig. 33).

Por consiguiente, C-HP ejerce un efecto antioxidante que podría favorecer la inhibición de la melanogénesis y contrarrestar los efectos derivados de la radiación solar.

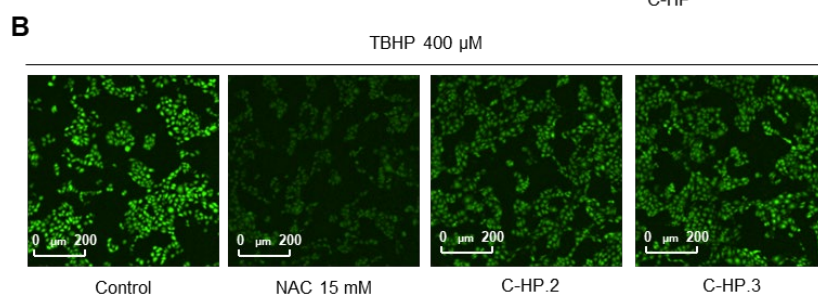
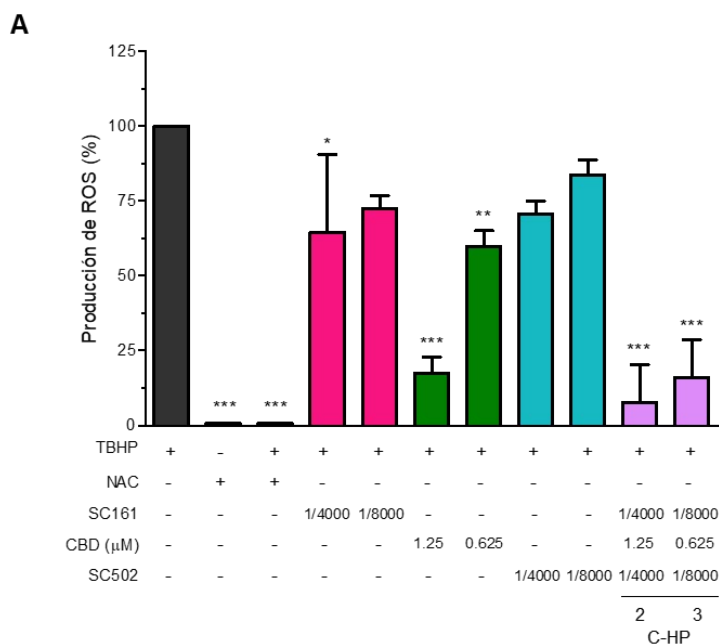


Figura 33. La combinación C-HP reduce la formación de ROS en queratinocitos. Las dosis seleccionadas de SC161, CBD y SC502 fueron testados por separado y en combinación durante 3 h en células HaCaT. TBHP (400 μM) y NAC (15 mM) fueron empleados como inductor e inhibidor de ROS, respectivamente. La producción de ROS fue evaluada por fluorescencia de la sonda H2DCFDA (2 μM) mediante el IncuCyte ZOOM. **A.** Porcentaje de producción de ROS considerando los valores del TBHP como el 100 %. Los resultados muestran la media \pm DE de una $n=3$. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ indica las diferencias significativas entre el TBHP y los ingredientes separados o en combinación. **B.** Imágenes obtenidas de la producción de ROS inducida por TBHP empleando IncuCyte ZOOM (objetivo 4x).

3.3.3 Inducción de la autofagia después del tratamiento con C-HP

Como consecuencia de la relación encontrada entre la autofagia y la pigmentación, se optó por analizar cómo afectan los ingredientes de manera independiente y en combinación en las células HaCaT sobre este proceso. De nuevo, los resultados mostraron que los ingredientes por separado no activaron de forma significativa la autofagia, pero esto sí se observaba cuando los queratinocitos eran tratados en combinación a la dosis de C-HP.2 (Fig. 34).

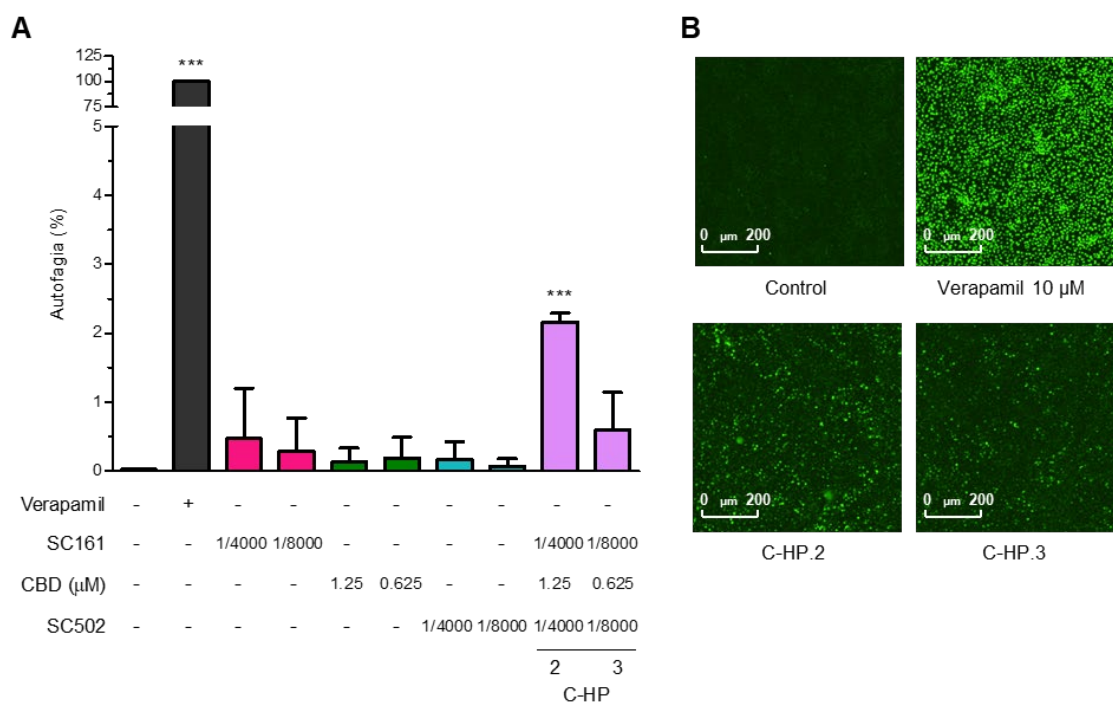


Figura 34. Inducción de autofagia en queratinocitos producido por el tratamiento con la combinación C-HP. Las células HaCaT fueron tratadas con los ingredientes por separado y en combinación durante 48 h. El Verapamil (10 μ M) fue utilizado como inductor de autofagia. La activación de la autofagia fue evaluada mediante la emisión de fluorescencia de la sonda CYTO-ID a través del InCuCyte ZOOM. **A.** Porcentaje de inducción de autofagia considerando los valores del Verapamil como el 100 % de activación. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre las células no tratadas y las tratadas. **B.** Imágenes representativas obtenidas por InCuCyte ZOOM (objetivo 4x) del ensayo de inducción de la autofagia.

3.3.4 Efecto despigmentante del tratamiento tópico con C-HP

Por último, se realizó un estudio de eficacia en 20 voluntarios a los que se aplicó de manera tópica una crema basada en C-HP durante 56 días. Los resultados demostraron que el tratamiento con la crema reducía el área total de manchas oscuras en un 4.5 y 8.5 % después de uno y dos meses de tratamiento, respectivamente (Fig. 35A). En el mismo sentido, se observó una reducción del total de manchas oscuras de un 5.6 y 11.2 % en los días 28 y 56 del tratamiento, respectivamente (Fig. 35B). También hubo una disminución en el contraste de color entre las regiones hiperpigmentadas y las no hiperpigmentadas en un 19.8 y un 31.3 % (día 28 y 56, respectivamente), de tal forma que, cuanto menor es el contraste, mayor fue la uniformidad del color de la piel (Fig. 35C y D).

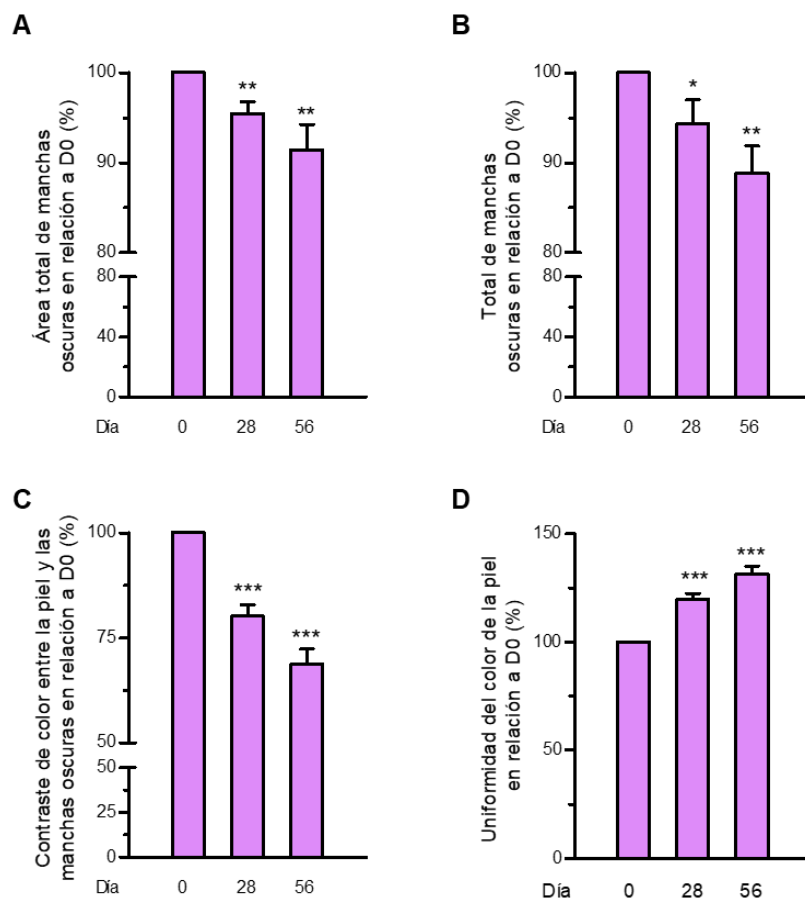


Figura 35. Efecto despigmentante de C-HP formulado en crema sobre la piel. Se evaluó la piel de 20 voluntarios antes del tratamiento (día 0) y después de 28 y 56 días de tratamiento. **A.** Estimación del área total de manchas oscuras en la región analizada. **B.** Evaluación del número total de manchas oscuras. **C.** Contraste de color entre la piel normal y las manchas oscuras. **D.** Análisis de la uniformidad del color entre la piel normal y el color de la mancha oscura. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indica las diferencias significativas entre el día 0 y el tratamiento con C-HP a 28 o 56 días.

En la figura 36 se muestra las imágenes obtenidas del voluntario 20 antes y durante el tratamiento con la crema de C-HP. Como se puede observar, en el día 28 ya se discierne un efecto despigmentante causado por el tratamiento, que se acentúa en la finalización de este.

A tenor de los resultados mostrados, los efectos de C-HP son prometedores para el tratamiento de patologías cuyos síntomas produzcan un aumento de la pigmentación cutánea.

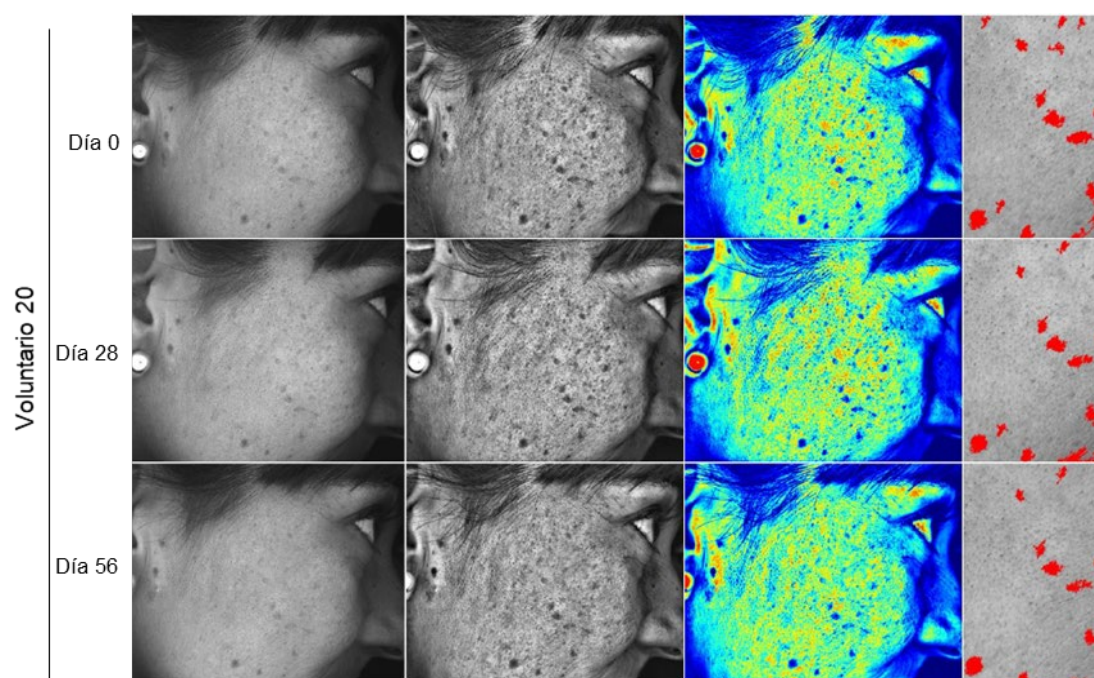


Figura 36. Evolución de las manchas oscuras después de la aplicación tópica de C-HP en crema. Evaluación al inicio de tratamiento (día 0) y después de 28 y 56 días de tratamiento. Imágenes correspondientes al voluntario 20 obtenidas con Bio Blue Light Scanner.

*4. Efecto de las estrigolactonas sobre
los principales procesos biológicos
inducidos en patologías de la piel*

4.1 Estudio de los efectos del estrigol y sus derivados sobre dianas biológicas de interés dermatológico

Se realizó un primer cribado de 26 derivados del estrigol, cuyas fórmulas químicas se muestran en la figura 37A, para analizar los efectos sobre las dianas NRF2, NF- κ B y STAT3, calculando su EC₅₀ o IC₅₀ para realizar una comparativa entre los diferentes compuestos y seleccionar los más potentes (Fig. 37B).

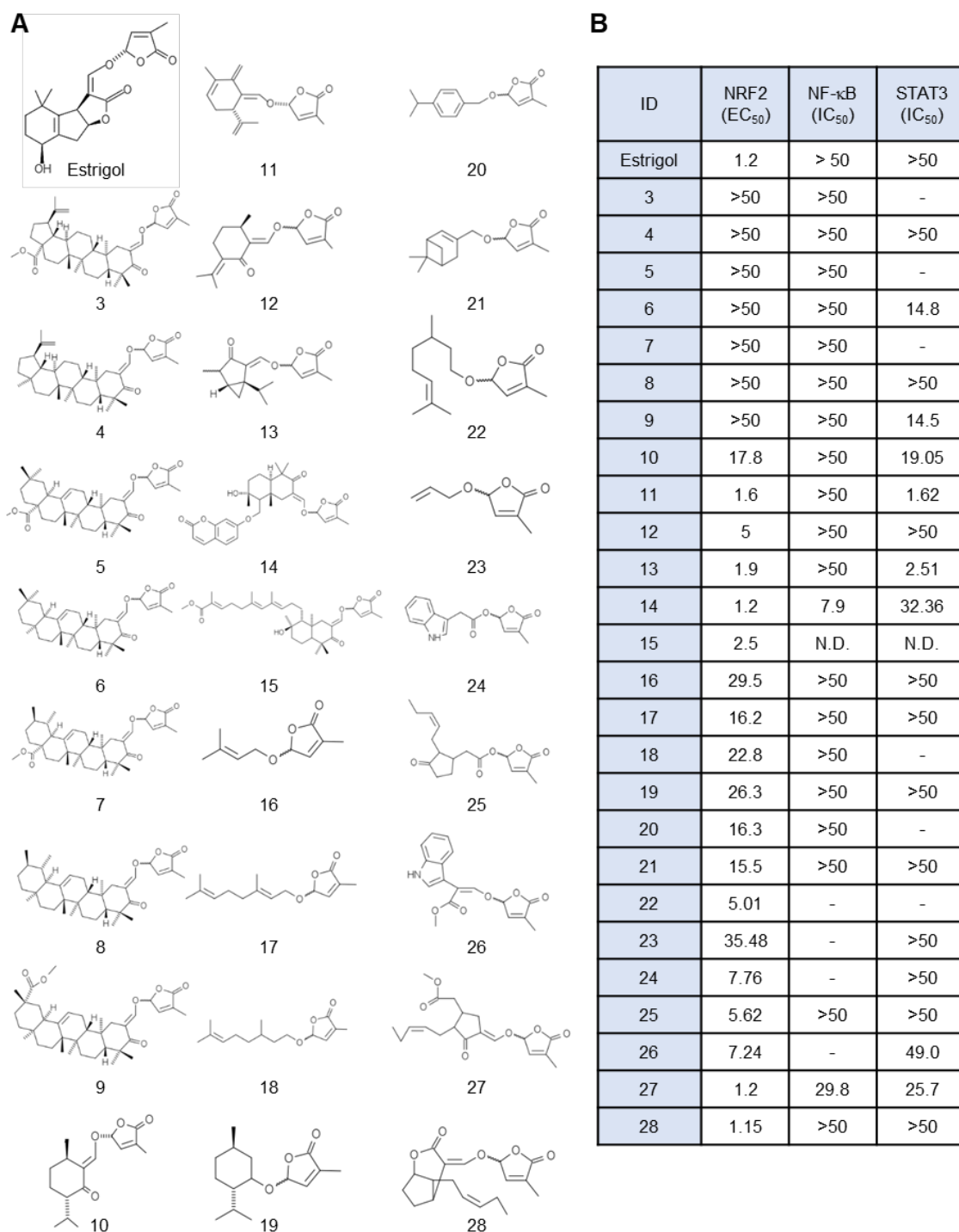


Figura 37. Actividades biológicas del estrigol y sus derivados. A. Fórmulas químicas. **B.** Tabla comparativa con la EC₅₀ para la inducción de NRF2 y la IC₅₀ para la inhibición de NF- κ B y STAT3 resultantes de 3 experimentos independientes.

De los resultados obtenidos, cabe destacar que, el derivado con los efectos más relevantes en los tres parámetros fue el compuesto 14. Al igual que el estrigol, presenta un EC₅₀ sobre NRF2 de 1.2 μ M, mientras que, incluso mejora los valores obtenidos por el estrigol en NF- κ B y STAT3 resultando unos IC₅₀ de 7.9 μ M y 32.36 μ M, respectivamente. Por ese motivo, se seleccionó como molécula más relevante para estudiar en detalle sus efectos biológicos.

4.2 El estrigol y el compuesto 14 poseen efecto antioxidante en queratinocitos

Para evaluar si el estrigol y el compuesto 14 protegen frente al estrés oxidativo, se analizó los efectos dosis-respuesta sobre la actividad transcripcional de NRF2 y la producción de ROS en queratinocitos (Fig. 38).

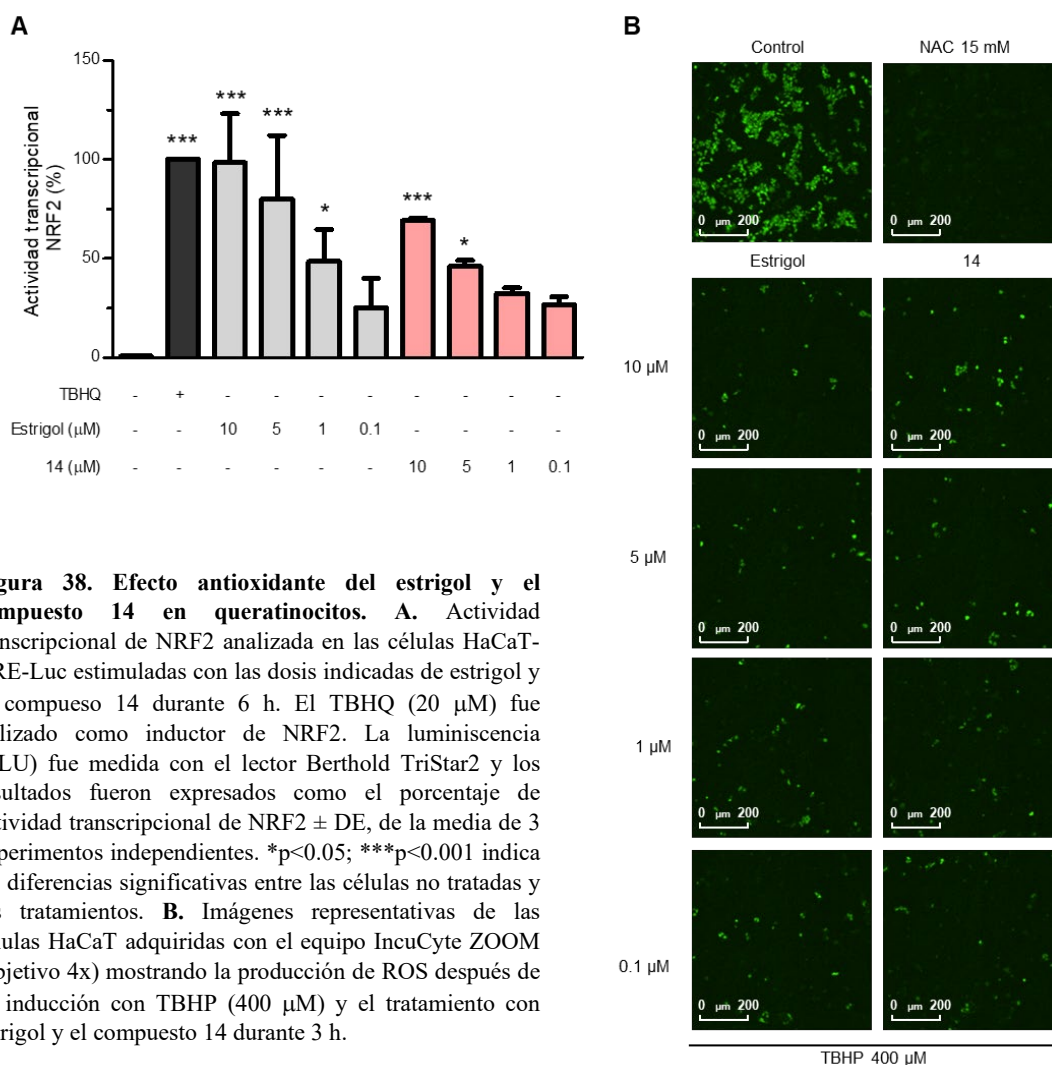


Figura 38. Efecto antioxidante del estrigol y el compuesto 14 en queratinocitos. **A.** Actividad transcripcional de NRF2 analizada en las células HaCaT-ARE-Luc estimuladas con las dosis indicadas de estrigol y el compuesto 14 durante 6 h. El TBHQ (20 μ M) fue utilizado como inductor de NRF2. La luminiscencia (RLU) fue medida con el lector Berthold TriStar2 y los resultados fueron expresados como el porcentaje de actividad transcripcional de NRF2 \pm DE, de la media de 3 experimentos independientes. * p <0.05; *** p <0.001 indica las diferencias significativas entre las células no tratadas y los tratamientos. **B.** Imágenes representativas de las células HaCaT adquiridas con el equipo IncuCyte ZOOM (objetivo 4x) mostrando la producción de ROS después de su inducción con TBHP (400 μ M) y el tratamiento con estrigol y el compuesto 14 durante 3 h.

Como se puede observar, ambos ingredientes indujeron de forma dosis-dependiente la transcripción de NRF2, siendo este efecto mayor en el estrigol a las dosis

más elevadas en comparación con el compuesto 14 (Fig. 38A). Seguidamente, se evaluó si ambas moléculas eran capaces de reducir los niveles de ROS que se encontraban inducidos por TBHP en las células HaCaT. Como se aprecia en las imágenes, tanto el estrigol como el compuesto 14 fueron capaces de reducir la formación de ROS inducida por TBHP (Fig. 38B).

Por tanto, ambos compuestos muestran propiedades antioxidantes, reduciendo el estrés oxidativo generado en los queratinocitos.

4.3 El compuesto 14 posee efectos antiinflamatorios

Debido a los resultados obtenidos en el primer cribado (Fig. 37B), se decidió evaluar en detalle los efectos del compuesto 14 sobre el mecanismo molecular de activación de NF- κ B (Fig. 39).

Para ello, se comparó los efectos del estrigol y el compuesto 14 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B en fibroblastos. Los resultados demostraron que el estrigol no tiene ningún efecto sobre esta actividad transcripcional, mientras que, el compuesto 14 causó la inhibición de NF- κ B en un 60.6 % y un 34.4 % a las dosis de 10 y 5 μ M, respectivamente (Fig. 39A).

Acto seguido, se estudió el efecto del compuesto 14 sobre la actividad quinasa de IKK β e IKK α . Para ello, se llevó a cabo la co-transfección con el plásmido KBF-Luc bien con IKK β , o bien, con IKK α en las células 293T. Como muestra la figura 39B, el compuesto 14 fue capaz de inhibir de manera significativa la actividad quinasa de IKK β a la dosis de 10 μ M, a diferencia de la actividad quinasa de IKK α , donde no mostró ningún efecto inhibitorio (Fig. 39C).

Además, se determinó los niveles de expresión de proteínas claves en esta ruta molecular de activación, cuya cuantificación reveló la inhibición de la expresión de las formas fosforiladas para NF- κ B/p65 e I κ B α a las dosis más elevadas (Fig. 39D).

Por tanto, el compuesto 14 es capaz de inhibir la actividad quinasa de IKK β , produciendo la inhibición de la fosforilación de I κ B- α , que a su vez, inhibe la activación de NF- κ B.

En conclusión, el compuesto 14 mejora los efectos biológicos del estrigol, haciéndole un candidato prometedor para el tratamiento de enfermedades de la piel que

cursen con estrés oxidativo e inflamación como es el caso de la dermatitis atópica o el acné, entre otras.

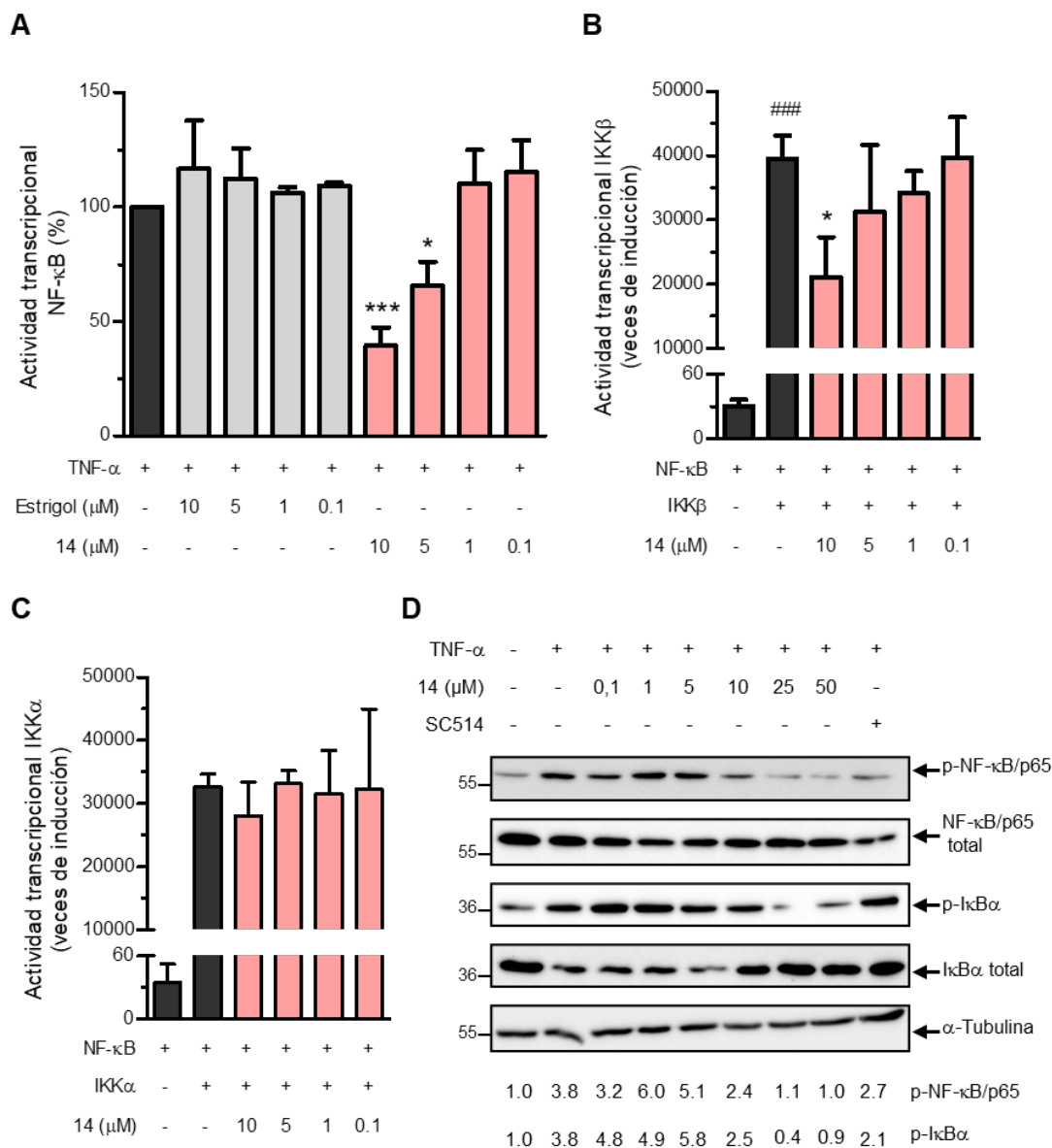


Figura 39. Efecto antiinflamatorio del compuesto 14. **A.** Las células NIH3T3-KBF-Luc fueron pre-incubadas con TNF- α (30 ng/ml) y luego se estimularon con el estrigol y el compuesto 14 a las dosis indicadas durante 6 h. La luminiscencia (RLU) fue medida utilizando el lector Berthol Tristar2. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad transcripcional de NF- κ B considerando los valores de TNF- α como 100 %. * p <0.05; *** p <0.001 indica las diferencias significativas entre el TNF- α y los tratamientos. **B y C.** Las células 293T fueron co-transfectadas con los plásmidos KBF-Luc e IKK β (**B**) o IKK α (**C**). Después de 24 h fueron estimuladas con el compuesto 14 a las dosis indicadas durante 6 h. La luminiscencia (RLU) fue medida con el lector de placas Berthold Tristar2. * p <0.05 indica las diferencias significativas entre las células no tratadas y el compuesto 14. ### p <0.001 indica las diferencias significativas entre la expresión de NF- κ B y la co-expresión de NF- κ B con IKK β . Los datos de las tres gráficas corresponden a la media de 3 experimentos independientes \pm DE. **D.** Niveles de expresión de proteína total y fosforilada de NF- κ B/p65 e I κ B α normalizado con α -Tubulina, en células NIH3T3-KBF-Luc tratadas con TNF- α , mediante Western Blot tras el tratamiento con el compuesto 14. El SC514 (50 μ M) fue utilizado como control de inhibición. La cuantificación fue llevada a cabo utilizando el programa ImageJ.

V. Discusión

Los desórdenes dermatológicos son un problema clínico muy común representando el 8.4 % de las consultas en Atención Primaria. En muchos casos, las afecciones de la piel afectan a la persona durante toda su vida desencadenando alteraciones psicológicas y físicas (208). Estos motivos son los que hacen que este tipo de afecciones supongan un desafío médico, que implica el desarrollo de nuevos tratamientos que mejoren sus síntomas. El resurgimiento de tratamientos basados en productos naturales está teniendo gran aceptación en el campo de la dermatología debido, fundamentalmente, a sus escasos efectos secundarios (145, 209).

Existen muchos estudios que demuestran los efectos beneficiosos que los extractos de plantas ejercen sobre patologías de la piel como el de *Arnica montana* (argán) utilizado en la dermatitis de contacto o urticaria o el de *Avena sativa* frente a la irritación (210). Uno de ellos, muy ampliamente estudiado, es el *Aloe vera*, el cual se suele aplicar en gel de manera tópica, siendo capaz de reducir lesiones psoriáticas en un 82.8 % después de 4 semanas de tratamiento (211). Además, ensayos *in vitro* demuestran que el *A. vera* induce la proliferación y migración de fibroblastos y queratinocitos, de tal modo que es capaz de acelerar la curación de heridas (212, 213). Por otro lado, desencadena protección frente a la radiación UV debido a la reducción de la fotooxidación de las membranas lipídicas (214).

El uso de ingredientes naturales con fines medicinales se lleva realizando desde tiempos remotos. Los primeros escritos sobre plantas medicinales proceden de Mesopotamia (2600 a.C.) y comprendían en torno a 1000 medicamentos derivados de plantas representados en tabletas de arcilla (215). También se conserva el “Papiro Ebers” (1500 a.C.), el cual contenía más de 700 medicamentos de origen vegetal o animal para su uso médico demostrando el amplio conocimiento de los ingredientes naturales que ya había en la medicina egipcia (216). El uso medicinal basado en lo natural se desarrolló por las diferentes regiones en base a las plantas disponibles localmente, siendo las hierbas ayurvédicas en India y las combinaciones de hierbas desarrolladas como parte de la medicina tradicional en China los más conocidos (217). Fue en el siglo XIX cuando se empezó a estudiar de manera racional el uso de las plantas como tratamiento, entre ellos destaca Friedrich Sertürner el cual aisló del opio la morfina como analgésico e inductor del sueño (218). A partir de ese momento, fueron muchos los productos bioactivos que se aislaron de sus fuentes naturales abriéndose el

camino de las compañías farmacéuticas que facilitaron la fabricación de productos naturales a partir de síntesis química (219).

Muchos extractos de plantas han sido utilizados y se siguen usando en la actualidad para el tratamiento de afecciones cutáneas. Uno de ellos es la sangre de drago, extraído de una planta de la Amazonia denominada *Croton lechleri*. Su salvia tiene propiedades vasoconstrictoras, antioxidantes, antimicrobianas y cicatrizantes y además, inhibe la proliferación de células T activas (220-225). Otro ejemplo, es el de la planta *Centella asiática*, de origen asiático, su extracto presenta actividades beneficiosas para la cicatrización, hidratación, antiinflamación, anti-prurito y antioxidante (226-228). Otro ingrediente natural muy conocido es la curcumina, extraído de la raíz de *Curcuma longa* originaria del suroeste de la India. Actualmente, la curcumina es muy utilizada porque presenta actividades anticancerígenas, fotoprotectoras, antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (229-231). Además, el extracto de *Arnica montana* (argán) es utilizado en la dermatitis de contacto o urticaria y el extracto de *Avena sativa* frente a la irritación (210). Otro extracto, muy ampliamente estudiado, es el *Aloe vera*, el cual se suele aplicar en gel de manera tópica siendo capaz de reducir lesiones psoriáticas en un 82.8 % después de 4 semanas de tratamiento (211). Ensayos *in vitro* demuestran que el *A. vera* induce la proliferación y migración de fibroblastos y queratinocitos, de tal modo que es capaz de acelerar la curación de heridas (212, 213). Por otro lado, desencadena protección frente a la radiación UV debido a la reducción de la fotooxidación de las membranas lipídicas (214).

Si bien se han adquirido evidencias experimentales para el uso de una gran variedad de ingredientes naturales a partir de estudios *in vitro* o *in vivo*, aún no se han verificado todos los mecanismos de acción y cada año se descubren nuevos ingredientes. En este contexto, la OMS ha incluido 21.000 plantas utilizadas para fines medicinales a nivel mundial (232).

Con el objetivo de buscar ingredientes que pudieran tener actividad sobre rutas moleculares implicadas en alteraciones cutáneas, se desarrolló la plataforma SimDerma que incluye experimentos que sirven como modelos celulares para el estudio del efecto de ingredientes sobre la piel, para posteriormente, seleccionar de esos ingredientes aquellos con mayor actividad con el fin de desarrollar combinaciones de interés dermatológico. Es evidente, que los datos obtenidos a nivel de rutas moleculares en un

tipo determinado de línea celular y permite generar una idea de los posibles efectos que cada ingrediente podría ejercer en la piel como primera aproximación, no obstante, dado que la piel no es una monocapa celular sino un conjunto de interacciones entre células, inervaciones, vascularización y apéndices que se coordinan de manera precisa, sería necesario corroborar su eficacia *a posteriori*. Por ello, junto a los resultados generados en SimDerma se podrían añadir otras herramientas tales como plataformas para el cribado de fármacos mediante la implementación de bioimpresoras 3D, las cuales son capaces de crear secciones de piel formada por diferentes tipos celulares dispuestas en diferentes capas imitando de manera más fidedigna la morfología de la piel (233, 234).

La plataforma SimDerma ha permitido realizar un cribado masivo de ingredientes y seleccionar los de mayor interés dermatológico. Posteriormente, los resultados obtenidos fueron corroborados por otros estudios científicos, o en algún caso, por ensayos en humanos, validando los datos de dicha plataforma de cribado. Entre todos los ingredientes testados, se focalizó la atención en el CBD y los derivados del estrigol, por su actividad antioxidante en el primer caso, y antioxidante y antiinflamatoria en el segundo.

El efecto del CBD se estudió en queratinocitos primarios a nivel del transcriptoma y proteoma. Como era de esperar, el tratamiento con CBD indujo genes y proteínas que estaban implicadas en la ruta molecular antioxidante de Nrf2. El mecanismo de acción del CBD sobre Nrf2 en queratinocitos primarios no había sido descrito previamente, pero en un estudio realizado en colaboración con la Universidad de Dundee, se demostró que el CBD era un inductor de Nrf2 en queratinocitos. Esta activación podría deberse al efecto del CBD sobre las diferentes proteínas que regulan la expresión de Nrf2, una de ellas, es la potente inducción que ejerce el CBD sobre la degradación citosólica de Bach1, el cual tiene la función de unirse a las proteínas pequeñas Maf bloqueando la unión de Nrf2 a las mismas y por tanto, la transcripción de genes de respuesta a estrés oxidativo (155, 235). Otra consecuencia directa de la reducción de Bach1 por CBD es el incremento en la expresión de la proteína HMOX1, implicada en la degradación de hemo generando monóxido de carbono, biliverdina y bilirrubina que presentan actividades antiinflamatorias y antioxidantes (236). El aumento de la degradación de Bach1 permite que el heterodímero Nrf2-proteínas pequeñas Maf se una a las regiones MARE y se active la transcripción de HMOX1 (237, 238). De hecho, los queratinocitos tratados con CBD analizados en los ensayos

transcriptómicos y proteómicos mostraron una inducción de HMOX1 en ambos casos. Además, estos resultados fueron ratificados también mediante el análisis de su ARNm y su expresión proteica a través de inmunohistoquímica, indicando que el CBD en queratinocitos actúa directamente sobre la ruta Bah1/Nrf2 pero no sobre la ruta clásica Keap1/Nrf2 (155).

El tratamiento con CBD incrementó los niveles de expresión génica y proteica de SQSTM1/p62, de la misma manera que se detectó en los niveles de ARNm de queratinocitos, así como en la piel del modelo animal. De tal modo que, la disminución de Bach1 por CBD podría hacer que los heterodímeros Nrf2-Maf se unieran a la región MARE transcribiéndose genes como SQSTM1/p62. A su vez, esta proteína secuestraría a Keap1 liberando a Nrf2 para su translocación al núcleo y permitiendo su acción, creando un ciclo de retroalimentación positiva sobre Nrf2 cuya activación podría romperse por la degradación de p62 mediante autofagia (80, 239, 240).

Por otro lado, se quiso evaluar si la inducción de HMOX1 y SQSTM1/p62 era debida a cambios de expresión en las proteínas pequeñas Maf, concretamente a MafB ya que inicialmente, resultó sobreexpresada en los análisis de transcriptómica y proteómica. Así, se observó alteraciones en la expresión de algunos genes y proteínas relacionados con MafB destacando el aumento de la CK16 tanto en los datos transcriptómicos como proteómicos. Esta relación podría deberse a que se ha demostrado que MafB se encuentra activado en la diferenciación de queratinocitos. De hecho, un estudio realizado en ratones carentes de MafB (MafB^{-/-}) mostró que tenían afectada la síntesis de profilagrina y disminuida la expresión de CK16. Además, también detectaron que en pacientes con DA MafB estaba reducido, así como los niveles de expresión de filagrina (185). Esta revelación llevó a plantear efectos del CBD sobre el proceso de diferenciación de los queratinocitos, cuya inducción se apreció en el ensayo de Ontología genética. En este caso, los incrementos de CK16 que se han observado a nivel proteico en HaCaT, ARNm en queratinocitos primarios y en el modelo animal, justifican la hipótesis de que el CBD podría estar favoreciendo la diferenciación gracias a la inducción de CK16.

Asimismo, se evaluó cómo afectaba el CBD sobre la morfología y el proceso de diferenciación de queratinocitos de la epidermis de los ratones tratados, ya que hasta el momento, el estudio de los efectos de CBD sobre piel sana no había sido estudiado. En

primer lugar, se detectó un incremento del espesor de la epidermis tratada con CBD en la tinción de hematoxilina-eosina y en segundo lugar, se encontró un aumento del marcador de proliferación Ki67 en la capa basal de la epidermis de los animales tratados con este cannabinoide. Estos resultados sugieren que el CBD induce también la proliferación de los queratinocitos del estrato basal, coincidiendo que son ellos los que poseen capacidad mitótica y por tanto, favoreciendo el engrosamiento de la epidermis cuando esta se encuentre alterada por factores como la edad. De hecho, numerosos estudios de envejecimiento de la piel se centran en la recuperación del grosor de la epidermis que se encuentra disminuido mediante el uso de moléculas como el retinol (241). A diferencia de lo expuesto anteriormente, el uso del CBD estaría contraindicado en patologías donde hay un engrosamiento de la epidermis, como en el caso de la psoriasis o las cicatrices queloides. En este último caso, aunque es poco conocido, existe un incremento del grosor epidérmico no asociado a proliferación sino más bien a defectos de expresión de la loricrina, una proteína involucrada en diferenciación temprana, provocando una desorganización estructural del estrato córneo (242). En cambio, en la psoriasis, hay una hiperqueratosis de la epidermis caracterizada por inflamación, desregulación de la proliferación, diferenciación y descamación de los queratinocitos (243). A pesar de esto, existe un estudio que demuestra que debido a la capacidad antioxidante del CBD, se reduciría los efectos de la peroxidación lipídica así como el estrés oxidativo generado durante el tratamiento con radiación UV en pacientes con lesiones psoriáticas (244).

Además de las actividades descritas para el CBD en la presente tesis, también existen otras con gran interés dermatológico que no han sido abordadas pero que han sido descritas en otros estudios. Por ejemplo, el CBD se caracteriza por su actividad antiinflamatoria ya que es capaz de reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-1 o TNF- α (155, 245). En el mismo sentido, también se ha descrito su capacidad antiinflamatoria y sebastática en sebocitos a través del receptor A2a vía AMPc y del receptor TRPV-4, respectivamente (246). Por último, cabe destacar el efecto antimicrobiano del CBD por inhibición de liberación de las vesículas de membrana liberadas por bacterias Gram-negativa, mientras que, para bacterias Gram-positiva también fue efectivo pero solo cuando se usaba en combinación con otros antibióticos, aunque sin afectar a la liberación de vesículas de membrana de la bacteria (247).

Por lo tanto, la aplicación traslacional del CBD debería ser sopesada para cada patología de la piel, ya que aunque tiene muchos efectos beneficiosos, todavía se conoce poco acerca de cómo podría afectar en otras rutas moleculares implicadas en la fisiología de los queratinocitos.

Del mismo modo que en el CBD, los datos aportados por SimDerma demostraron un interesante efecto del estrigol sobre Nrf2. Esto derivó en el estudio de esta molécula y derivados con modificaciones específicas con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con actividades más potentes que el estrigol (248). Para ello, se obtuvieron 26 derivados del estrigol que fueron testados en los ensayos de inducción de Nrf2 e inhibición de NF- κ B y STAT3. De todos ellos, los compuestos 14 y 27 mostraron, no solo que mantenían la actividad de Nrf2 que presentaba el estrigol, sino que eran activos para las otras dos actividades mencionadas anteriormente, a diferencia de la molécula de origen.

Tanto el estrigol como el compuesto 14 fueron capaces de inhibir la producción de ROS en HaCaT lo cual, sumado al efecto sobre Nrf2 permitió concluir que son capaces de reducir el estrés oxidativo. Se desconoce el mecanismo por el cual esto sucede, abriéndose una línea de investigación similar a la que se realizó con el CBD para analizar el mecanismo de acción que ejerce sobre la ruta de Nrf2.

En cambio, con los datos obtenidos para la inhibición de NF- κ B, se pudo concluir que el compuesto 14, pero no el estrigol, era capaz de inhibir la transcripción de NF- κ B, por inhibición de IKK β pero no de IKK α . IKK β es la principal quinasa responsable de la activación canónica de NF- κ B y su inhibición provoca que I κ B α no se fosforile y por tanto, no se poliubiquitine evitándose su degradación por el proteosoma. Los resultados han evidenciado que los niveles de I κ B α fosforilada estaban disminuidos, acumulándose I κ B α total al no poder degradarse. Su mecanismo de acción sería similar al de otras moléculas ya descritas como el Crocin, un extracto de *Gardenia jasminoides*, el cual inhibe la fosforilación de I κ B α , bloqueando la activación de NF- κ B (249). Todo ello sugiere que el compuesto 14 podría actuar del mismo modo provocando que I κ B α permanezca unido a NF- κ B, impidiendo su liberación y por tanto, quedando retenido en el citoplasma de tal modo que no se puede translocar al núcleo ni unirse a las regiones del ADN promotoras de sus genes específicos (250). Por tanto, el compuesto 14 ejerce un efecto antiinflamatorio por la regulación de la vía de NF- κ B.

Dado que la investigación que hasta el momento existe sobre las estrigolactonas se ha centrado en los campos de la botánica y aplicación en agricultura, sus efectos en humanos son todavía muy desconocidos (251). Los escasos estudios se han enfocado en su efecto anticancerígeno en cáncer de mama y hepatocelular, mientras que no hay ninguna publicación relacionada con el área de dermatología (165, 166, 168). Es por este motivo, que los datos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo son pioneros y abren un abanico de posibilidades para ampliar el conocimiento y convertir a las estrigolactonas en potenciales ingredientes para el tratamiento de enfermedades dermatológicas.

Este hecho, fue determinante para seleccionar al CBD frente al compuesto 14 para el desarrollo de las combinaciones, puesto que el CBD está aceptado para su uso en humanos y el conocimiento que se tiene sobre él lo abala. Como se ha mencionado anteriormente, aunque el CBD tiene efectos beneficiosos, es importante el análisis de este sobre cada patología en concreto. La finalidad de este trabajo ha sido el desarrollo de tres combinaciones enfocadas a tres tipos de alteraciones, la DA, el acné y los trastornos hiperpigmentarios teniendo en todas ellas el CBD como ingrediente común. No obstante, el desarrollo de nuevas combinaciones basadas en CBD frente a otras patologías como la fibrosis o la psoriasis está abierto en futuras investigaciones.

La combinación **C-DA** mostró datos interesantes en los ensayos *in vitro* sobre dianas moleculares que estaban alteradas en DA. El componente inflamatorio de la enfermedad viene determinado por un aumento de las citoquinas proinflamatorias en la región afectada. Por ello, no es de extrañar que aplicar ingredientes naturales como el Crocin que es capaz de bloquear la vía NF- κ B/STAT6 o el Pulegone (aceite esencial de la familia de las *Labiadas*) que suprime los niveles de citoquinas proinflamatorias a través de inhibición de la fosforilación de MAPK y degradación de I κ B α mejoren los síntomas de la DA (249, 252). Siguiendo este mismo razonamiento, los efectos de inhibición de NF- κ B tras aplicar la combinación C-DA y concretamente, gracias a la actividad del SC277 y el SC200 podría ser beneficiosas para contrarrestar los síntomas inflamatorios de la DA. En relación a esto, previos estudios han evidenciado el poder antiinflamatorio de un alcaloide descubierto en la especie *Narcissus* y la reducción de TNF- α a través de NF- κ B del extracto de *Uncaria tomentosa*, lo que podría justificar la actividad anti-NF- κ B observada (188, 253). En paralelo, la inflamación de la DA también está asociada a los valores disminuidos de PPAR α característico en las lesiones

de DA (254). Por lo que el principal motivo de incluir el ingrediente SC155 a C-DA fue por su capacidad agonista de PPAR α . En este mismo sentido actúa Eupatilin, un flavonoide obtenido de la especie *Artemisia* que incrementa la expresión de PPAR α mejorando los síntomas de la DA (255).

Por otro lado, el estrés oxidativo asociado a esta infiltración de células inmunes, así como a los efectos de agentes externos causados por la desestabilización de la barrera epidérmica, podría ser reducido por la aplicación de C-DA debido a su capacidad de inhibir ROS. Este efecto es aportado por los ingredientes CBD, SC277 y SC200, cuya actividad antioxidante ya ha sido demostrada en otros estudios previos (155, 186, 256). La alteración de la FLG en DA fue fundamental para incluir el SC277 en la combinación C-DA, ya que posee una fuerte actividad inductora de FLG. Curiosamente, aunque se conoce mucho sobre la implicación de la FLG en la DA, hay pocos estudios con tratamientos para la inducción de la expresión de FLG, lo que convierte a C-DA en una fórmula novedosa en este aspecto (257, 258).

Finalmente, quizá sea el prurito el síntoma que cause más malestar en la DA y que empeora aún más el estado de la epidermis. Por ello, fue esencial que el SC200 aportara a C-DA la capacidad de antagonizar los receptores TRPV-1 para así evitar el picor que desencadena la apertura de estos canales. De hecho, numerosos ingredientes que se aplican de manera tópica para esta patología presentan esta actividad (259). Por ejemplo, ingredientes naturales como el Pellitorine extraído de *Tetradium daniellii* o el Voacangine extraído de *Voacanga africana* también se comportan como antagonistas de TRPV-1 (260, 261).

En cuanto a la combinación antiacné **C-AC**, ha sido desarrollada con el fin de paliar los efectos que se presentan debido a la desregulación de la composición del sebo. Como se ha visto previamente, en el sebo se produce un aumento de la proporción de escualeno, que se oxida generando estrés oxidativo (262). Esta es la razón por la que en estas lesiones hay que promover la reducción de ROS como hace el extracto de lúpulo, que además de antioxidante, es también antibacteriano frente a *P. acnes* (263). En el caso de la combinación C-AC el efecto antioxidante se obtiene gracias al CBD y el SC285. Este cambio en la composición del sebo conlleva la entrada de bacterias como *P. acnes* y un estado inflamatorio de todo el área afectada formando los comedones (118). Por lo tanto, disminuir la inflamación es uno de los objetivos de los tratamientos

antiacné, como lo hacen el extracto de *Magnifera indica* o el de *Kaempferia parviflora* disminuyendo las citoquinas proinflamatorias IL-8 o TNF- α , respectivamente (264, 265). En este sentido, C-AC fue capaz de inhibir la transcripción de NF- κ B inducida por TNF- α . De todos los ingredientes constituyentes fue el SC285 quien otorga esta actividad, lo cual era esperado ya que se conoce el poder antiinflamatorio de la epigallocatequina galato (EGCg) cuya molécula es el componente activo de este ingrediente (266, 267).

Por otro lado, en la plataforma SimDerma no existe ningún ensayo capaz de analizar si un ingrediente tiene capacidad antibiótica, pero teniendo en cuenta que la inducción de HIF-1 α favorece la síntesis de péptidos antimicrobianos se persiguió que C-AC fuera capaz de inducir HIF-1 α debido a la presencia del SC285, favoreciendo la respuesta inmune frente a bacterias (194, 268). Aunque ya se había descrito la actividad antibiótica de EGCg, al reducir el número de UFC de *P. acnes*, no se ha asociado directamente a una inducción de HIF-1 α (269). En este sentido, se encontró bastante controversia, ya que los resultados en SimDerma mostraron que SC285 indujo HIF-1 α , mientras que en algunos estudios encontraron que EGCg inhibe HIF-1 α , si bien es cierto, que en todos ellos los resultados se obtuvieron en células tumorales y bajo condiciones de hipoxia (270-272). En cambio, al igual que en SimDerma, otro estudio realizado en células de cáncer de próstata demostró que EGCg inducía la transcripción de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) e incrementaba la expresión de HIF-1 α en condiciones de normoxia por inhibición de su degradación (273).

Aunque recientemente se ha visto la capacidad antibiótica que tiene el CBD, en esta tesis se ha demostrado de forma específica su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. acnes* (247). En el caso de SC285 sería esperable encontrar esta actividad antibiótica para *P. acnes* puesto que se ha descrito con la EGCg (269). Sin embargo, sería interesante comprobar si alguno de los otros ingredientes de la combinación C-AC presentan dicha actividad de forma individual y su respuesta de forma conjunta. Por otro lado, cabe destacar que C-AC disminuía drásticamente la actividad de la enzima hialuronidasa, sorprendentemente, el efecto que tenía la combinación C-AC era mayor que cualquiera de los ingredientes por separado, ya que solo el SC285 y el SC185 mostraban una inhibición ligera de la enzima. En el caso del SC285, los resultados son concordantes con las evidencias previas de actividad inhibitoria de la hialuronidasa por parte de EGCg (274). Este ensayo, aunque no está

incorporado en SimDerma, se decidió incluir en el estudio de la combinación porque se había visto que *P. acnes* presentaba el gen para la enzima de la hialuronidasa promoviendo la degradación del ácido hialurónico de la piel (275).

Cabe resaltar, que hubiera sido de interés el estudio de los ingredientes y de la combinación sobre los sebocitos, ya que se ha descrito que el CBD y el EGCg presentan actividad seboestática disminuyendo la lipogénesis (246, 269).

En definitiva, se ha demostrado que el SC285 formado por EGCg es óptimo como tratamiento para el acné, y al combinarlo con el CBD y SC185 se han mejorado sus propiedades de forma notable, ya que el SC185 mejoró la inhibición de la enzima hialuronidasa y el CBD aportó su efecto antioxidante y antibiótico.

Finalmente, los ingredientes de la combinación **C-HP** creada para los trastornos hiperpigmentarios, mostraron en SimDerma actividades muy interesantes, pero en algunas ocasiones, al reducir las dosis cuando se combinaron para evitar la citotoxicidad de C-HP, se perdían los efectos individuales, mientras que en combinación los efectos eran muy prometedores. Por ejemplo, a diferencia de los ingredientes de forma individual, el tratamiento con C-HP mostró una reducción clara en la producción en melanina y de la actividad de la enzima tirosinasa que es clave en melanogénesis. Sin embargo, no parece afectar a otras proteínas de este proceso como MITF, TRP1 o TRP2. Por lo que su acción despigmentante podría ser por una inhibición directa de la tirosinasa, al igual que ocurre con otros ingredientes tales como el extracto *Paeonia suffruticosa* o el extracto de corteza de *Magnolia officinalis* (276, 277).

Además, la combinación C-HP inhibe el estrés oxidativo por reducción de ROS, en este caso los tres ingredientes que componen la combinación de manera independiente sí presentan inhibición de ROS, de hecho, hay estudios previos que lo demuestran (202, 203, 206). Por otro lado, la inducción de autofagia por C-HP tuvo un incremento sinérgico en la combinación en comparación con los ingredientes testados por separado, siendo el SC502 quien mostraba mayor actividad en los datos de SimDerma. Aunque no hay referencias acerca de que extractos de *Pinus radiata* influyan sobre la actividad autofágica, sí las hay acerca de que la inducción de autofagia aumenta la degradación de los melanosomas y por tanto, disminuye la acumulación de melanina en los queratinocitos (38, 278). Sumado a estos resultados *in vitro*, se demostró la eficacia de C-HP para trastornos hiperpigmentarios en voluntarios por

reducción del área y el número de manchas, así como del contraste de color entre las regiones hiperpigmentadas y las sanas, siendo un prometedor tratamiento que actualmente se encuentra en tramitación para la aceptación de patente europea (Número de aplicación: EP-08153).

En la presente tesis se muestra que el uso de la plataforma SimDerma ha revelado resultados importantes para el CBD y las estrigolactonas que posteriormente, han sido validados a través del estudio más en profundidad de dichos ingredientes. Por otro lado, SimDerma también ha permitido seleccionar ingredientes con actividades de interés dermatológico para acompañar y complementar a las que ya posee el CBD, con el objetivo de crear combinaciones que modulan dianas moleculares para la mejora de la sintomatología de tres patologías de la piel (Fig. 40). Además, se propone que esta plataforma no se limite a las dianas biológicas actuales, sino que esté sometida a una constante evolución y expansión con el objetivo de incrementar la información resultante de ella. En definitiva, SimDerma ha demostrado ser una herramienta eficaz y prometedora para cribar ingredientes de interés dermatológico para el tratamiento tópico de afecciones en la piel.

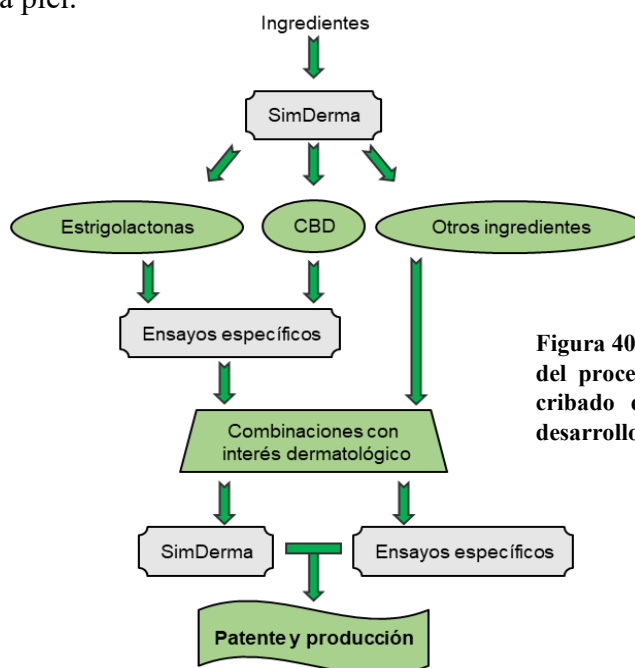


Figura 40. Esquema representativo del proceso desarrollado desde el cribado del ingrediente hasta el desarrollo de la combinación

VI. Conclusiones

1. La plataforma SimDerma es un eficaz método de cribado masivo de ingredientes orientado a dianas moleculares con interés dermatológico. Sus resultados han permitido seleccionar aquellos que presenten un mayor interés para cada diana molecular analizada.
2. El CBD desencadena la respuesta de genes con actividad antioxidante reduciendo el estrés oxidativo, además de inducir la expresión de marcadores implicados en la diferenciación y proliferación de queratinocitos, incrementado el grosor de la epidermis.
3. Se ha identificado un nuevo derivado del estrigol, el **compuesto 14**, con actividad antioxidante y antiinflamatoria por inhibir la activación de las rutas STAT3 y NF- κ B.
4. La combinación **C-DA** demostró ser una combinación de ingredientes naturales potencialmente efectiva para el tratamiento de la DA, ya que está basada en ingredientes de origen natural capaces de reducir el estrés oxidativo, inhibir la inflamación por reducción de la expresión de NF- κ B y paliar el prurito debido a su efecto antagónico sobre TRPV-1, así como promover la restauración de la epidermis a través de la activación de FLG.
5. **C-AC** demostró ser una combinación de ingredientes naturales potencialmente efectiva para el tratamiento del acné debido a su capacidad antioxidante, la inhibición de NF- κ B, la inducción de HIF-1 α para la mejora de la respuesta inmune y la inhibición de la actividad de la hialuronidasa pudiendo contrarrestar los daños ejercidos por *P. acnes*.
6. La combinación **C-HP** posee la capacidad *in vitro* de inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa y del estrés oxidativo e inducción del proceso de autofagia, conllevando a la reducción de la síntesis y acumulación de la melanina. Además, se ha demostrado su eficacia despigmentante en la piel de voluntarios, siendo un tratamiento prometedor frente a trastornos hiperpigmentarios de la piel.

VII. Referencias bibliográficas

1. Janus JM, O'Shaughnessy RFL, Harwood CA, & Maffucci T (2017) Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Signalling Pathways in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* 9(7).
2. Simpson CL, Patel DM, & Green KJ (2011) Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(9):565-580.
3. Kanitakis J (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12(4):390-399; quiz 400-391.
4. Yousef H, Alhajj M, & Sharma S (2019) Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls, Treasure Island (FL)).
5. Leroy M, Lafleur M, Auger M, Laroche G, & Pouliot R (2013) Characterization of the structure of human skin substitutes by infrared microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 405(27):8709-8718.
6. Chapman SJ & Walsh A (1990) Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 282(5):304-310.
7. Shetty S & Gokul S (2012) Keratinization and its disorders. *Oman Med J* 27(5):348-357.
8. Matsui T, y cols. (2011) SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med* 3(6):320-333.
9. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, & Irvine AD (2009) Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 124(3 Suppl 2):R2-6.
10. Wu M & Crane JS (2019) Biochemistry, Collagen Synthesis. StatPearls, Treasure Island (FL)).
11. Uitto J, Li Q, & Urban Z (2013) The complexity of elastic fibre biogenesis in the skin--a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Experimental dermatology* 22(2):88-92.
12. Khavkin J & Ellis DA (2011) Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am* 19(2):229-234.
13. Basler K, y cols. (2016) The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 242:105-118.

14. Quaresma JAS (2019) Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 32(4).
15. Mhashilkar AM, y cols. (2002) Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes. *Gene Ther* 9(5):307-319.
16. Kawai K, y cols. (2002) Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *Journal of dermatological science* 30(3):185-194.
17. Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, & Gallo RL (2005) Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun* 73(10):6771-6781.
18. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, Sirvent S, & Polak ME (2017) Langerhans Cells-Programmed by the Epidermis. *Frontiers in immunology* 8:1676.
19. Tam I & Stepien K (2011) Secretion of proinflammatory cytokines by normal human melanocytes in response to lipopolysaccharide. *Acta Biochim Pol* 58(4):507-511.
20. Le Poole IC, y cols. (1993) Phagocytosis by normal human melanocytes in vitro. *Exp Cell Res* 205(2):388-395.
21. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, & Nickoloff BJ (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9(10):679-691.
22. Weiss G & Schaible UE (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 264(1):182-203.
23. Kabashima K, y cols. (2018) Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation. *Immunol Rev* 282(1):114-120.
24. Grice EA, y cols. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324(5931):1190-1192.
25. Scharschmidt TC, y cols. (2015) A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity* 43(5):1011-1021.
26. Gallo RL & Hooper LV (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12(7):503-516.
27. Oh J, y cols. (2016) Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* 165(4):854-866.

28. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, & Scott IR (2000) Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *International journal of cosmetic science* 22(1):21-52.
29. Mojumdar EH, y cols. (2016) Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochim Biophys Acta* 1858(8):1926-1934.
30. Bjorklund S, y cols. (2014) Stratum corneum molecular mobility in the presence of natural moisturizers. *Soft Matter* 10(25):4535-4546.
31. Liebel F, Kaur S, Ruvoletto E, Kollias N, & Southall MD (2012) Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *The Journal of investigative dermatology* 132(7):1901-1907.
32. Freitas JV, Junqueira HC, Martins WK, Baptista MS, & Gaspar LR (2019) Antioxidant role on the protection of melanocytes against visible light-induced photodamage. *Free Radic Biol Med* 131:399-407.
33. Ando H, y cols. (2012) Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *The Journal of investigative dermatology* 132(4):1222-1229.
34. Ito S & Wakamatsu K (2008) Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84(3):582-592.
35. Del Bino S, Sok J, Bessac E, & Bernerd F (2006) Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res* 19(6):606-614.
36. He C & Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67-93.
37. Zhang CF, y cols. (2015) Suppression of autophagy dysregulates the antioxidant response and causes premature senescence of melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 135(5):1348-1357.
38. Murase D, y cols. (2013) Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 133(10):2416-2424.
39. Oaklander AL & Siegel SM (2005) Cutaneous innervation: form and function. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53(6):1027-1037.

40. Oaklander AL, Stocks EA, & Mouton PR (2003) Number of Langerhans immune cells in painful and non-painful human skin after shingles. *Arch Dermatol Res* 294(12):529-535.
41. Iheanacho F & Vellipuram AR (2019) Physiology, Mechanoreceptors. StatPearls, Treasure Island (FL)).
42. Rhodes NG, Murthy NS, Lachman N, & Rubin DA (2019) Normal Pacinian corpuscles in the hand: radiology-pathology correlation in a cadaver study. *Skeletal Radiol* 48(10):1591-1597.
43. Feng J & Hu H (2019) A novel player in the field: Merkel disc in touch, itch and pain. *Experimental dermatology*.
44. Loeser JD & Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137(3):473-477.
45. Kobayashi S (2015) Temperature receptors in cutaneous nerve endings are thermostat molecules that induce thermoregulatory behaviors against thermal load. *Temperature (Austin)* 2(3):346-351.
46. Caterina MJ & Pang Z (2016) TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)* 9(4).
47. Ramsey IS, Delling M, & Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-647.
48. Voets T, y cols. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430(7001):748-754.
49. Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y, & Liedtke WB (2018) Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neurosci Bull* 34(1):120-142.
50. Peters EM, y cols. (2006) Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *The Journal of investigative dermatology* 126(9):1937-1947.
51. Rio CD, y cols. (2018) The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. *Biochem Pharmacol* 157:122-133.
52. Stander S, Schmelz M, Metze D, Luger T, & Rukwied R (2005) Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *Journal of dermatological science* 38(3):177-188.
53. Pucci M, y cols. (2012) Endocannabinoids stimulate human melanogenesis via type-1 cannabinoid receptor. *The Journal of biological chemistry* 287(19):15466-15478.

54. Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, & Maccarrone M (2008) Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 283(10):6005-6012.
55. Toth BI, y cols. (2011) Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *The Journal of investigative dermatology* 131(5):1095-1104.
56. Kim HJ, y cols. (2015) Topical cannabinoid receptor 1 agonist attenuates the cutaneous inflammatory responses in oxazolone-induced atopic dermatitis model. *Int J Dermatol* 54(10):e401-408.
57. Ramot Y, y cols. (2013) A novel control of human keratin expression: cannabinoid receptor 1-mediated signaling down-regulates the expression of keratins K6 and K16 in human keratinocytes in vitro and in situ. *PeerJ* 1:e40.
58. Chiurciu V (2016) Endocannabinoids and Immunity. *Cannabis and cannabinoid research* 1(1):59-66.
59. Hwang YS, y cols. (2017) Cannabidiol upregulates melanogenesis through CB1 dependent pathway by activating p38 MAPK and p42/44 MAPK. *Chem Biol Interact* 273:107-114.
60. Dobrosi N, y cols. (2008) Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J* 22(10):3685-3695.
61. Bilir KA, Anli G, Ozkan E, Gunduz O, & Ulugol A (2018) Involvement of spinal cannabinoid receptors in the antipruritic effects of WIN 55,212-2, a cannabinoid receptor agonist. *Clin Exp Dermatol* 43(5):553-558.
62. Man MQ, y cols. (2006) Basis for improved permeability barrier homeostasis induced by PPAR and LXR activators: liposensors stimulate lipid synthesis, lamellar body secretion, and post-secretory lipid processing. *The Journal of investigative dermatology* 126(2):386-392.
63. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, & Reichrath J (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin: importance of PPARs in skin physiology and dermatologic diseases. *American journal of clinical dermatology* 9(1):15-31.

64. Trivedi NR, y cols. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *The Journal of investigative dermatology* 126(9):2002-2009.
65. Schmuth M, y cols. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 122(4):971-983.
66. Chen L, y cols. (2018) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9(6):7204-7218.
67. May MJ & Ghosh S (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19(2):80-88.
68. Wullaert A, Bonnet MC, & Pasparakis M (2011) NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 21(1):146-158.
69. Kim EK & Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802(4):396-405.
70. Kim HK, Lim S, Bae MJ, Lee W, & Kim S (2019) PG102 Upregulates IL-37 through p38, ERK, and Smad3 Pathways in HaCaT Keratinocytes. *Mediators of inflammation* 2019:6085801.
71. Tan Q, Yang H, Liu E, & Wang H (2017) P38/ERK MAPK signaling pathways are involved in the regulation of filaggrin and involucrin by IL17. *Mol Med Rep* 16(6):8863-8867.
72. Akira S, y cols. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77(1):63-71.
73. Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(2).
74. Sano S, Chan KS, & DiGiovanni J (2008) Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *Journal of dermatological science* 50(1):1-14.
75. Finkel T (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194(1):7-15.
76. Burton GJ & Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25(3):287-299.
77. Tonelli C, Chio IIC, & Tuveson DA (2018) Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 29(17):1727-1745.

78. Kobayashi M & Yamamoto M (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46:113-140.
79. Marro S, y cols. (2010) Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* 95(8):1261-1268.
80. Kageyama S, y cols. (2018) Negative Regulation of the Keap1-Nrf2 Pathway by a p62/Sqstm1 Splicing Variant. *Molecular and cellular biology* 38(7).
81. Attucks OC, y cols. (2014) Induction of heme oxygenase I (HMOX1) by HPP-4382: a novel modulator of Bach1 activity. *PLoS One* 9(7):e101044.
82. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, & Burton GJ (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol* 170(5):1511-1520.
83. Hool LC & Corry B (2007) Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 9(4):409-435.
84. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, & Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1-2):23-38.
85. Rojo de la Vega M, Krajisnik A, Zhang DD, & Wondrak GT (2017) Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection: Focus on the Achiote-Derived Apocarotenoid Bixin. *Nutrients* 9(12).
86. Telorack M, y cols. (2016) A Glutathione-Nrf2-Thioredoxin Cross-Talk Ensures Keratinocyte Survival and Efficient Wound Repair. *PLoS Genet* 12(1):e1005800.
87. Clark RA (2001) Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 936:355-367.
88. Guo S & Dipietro LA (2010) Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89(3):219-229.
89. Peyssonnaud C, y cols. (2007) Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 178(12):7516-7519.

90. Semenza GL (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365(6):537-547.
91. Hong WX, y cols. (2014) The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3(5):390-399.
92. Soriano JB, y cols. (2018) The burden of disease in Spain: Results from the Global Burden of Disease 2016. *Med Clin (Barc)* 151(5):171-190.
93. Karimkhani C, y cols. (2017) Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatol* 153(5):406-412.
94. Flohr C & Mann J (2014) New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy* 69(1):3-16.
95. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, & Irvine AD (2018) Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers* 4(1):1.
96. Thomsen SF (2014) Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy* 2014:354250.
97. Stalder JFT, S.; Atherton, D.J.; Bieber, P.; Bonifazi, E.; Broberg, A.; Calza, A.; Coleman, R.; De Prost, Y.; Stalder, J.F.; Gelmetti, C; Cuannetti, A.; Harper, J.; Künz, B.; Lachapelle, J.M.; Langeland, T.; Lever, R.; Oranje, A.P.; Oueille-Roussel C.; Revuz J. Ring, J.; Roujeau, J.C.; Saurat, J.H.; Song, M.; Tennstedt, D.; Van Neste, D.; Vieluf, D.; Poncet, M. (1993) Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186(1):23-31.
98. Wollenberg A, y cols. (2018) Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 32(6):850-878.
99. Chu H, y cols. (2017) Clinical Diversity of Atopic Dermatitis: A Review of 5,000 Patients at a Single Institute. *Allergy, asthma & immunology research* 9(2):158-168.
100. Nygaard U, Deleuran M, & Vestergaard C (2017) Emerging Treatment Options in Atopic Dermatitis: Topical Therapies. *Dermatology* 233(5):333-343.
101. Nowicki R, y cols. (2015) Atopic dermatitis: current treatment guidelines. Statement of the experts of the Dermatological Section, Polish Society of

- Allergology, and the Allergology Section, Polish Society of Dermatology. *Postepy dermatologii i alergologii* 32(4):239-249.
102. Palmer CN, y cols. (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38(4):441-446.
103. Howell MD, y cols. (2009) Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 124(3 Suppl 2):R7-R12.
104. Elias PM & Schmuth M (2009) Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 9(4):265-272.
105. Caubet C, y cols. (2004) Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *The Journal of investigative dermatology* 122(5):1235-1244.
106. Neuber K & Konig W (1992) Effects of *Staphylococcus aureus* cell wall products (teichoic acid, peptidoglycan) and enterotoxin B on immunoglobulin (IgE, IgA, IgG) synthesis and CD23 expression in patients with atopic dermatitis. *Immunology* 75(1):23-28.
107. Pallon J, Malmqvist KG, Werner-Linde Y, & Forslind B (1996) Pixe analysis of pathological skin with special reference to psoriasis and atopic dry skin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42(1):111-118.
108. Igawa S, y cols. (2017) Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 137(2):449-456.
109. Szegedi K, y cols. (2012) Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin. *Experimental dermatology* 21(6):431-436.
110. Leung DY (1993) Role of IgE in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 5(6):956-962.
111. Omata N, y cols. (2001) Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69(2):223-228.
112. Sivaranjani N, Rao SV, & Rajeev G (2013) Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res* 7(12):2683-2685.
113. Dahten A, Mergemeier S, & Worm M (2007) PPARgamma expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis. *Allergy* 62(8):926-933.

114. Staumont-Salle D, y cols. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 121(4):962-968 e966.
115. Gibson RA, y cols. (2014) A randomised trial evaluating the effects of the TRPV1 antagonist SB705498 on pruritus induced by histamine, and cowhage challenge in healthy volunteers. *PLoS One* 9(7):e100610.
116. Kittaka H & Tominaga M (2017) The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. *Allergol Int* 66(1):22-30.
117. Yun JW, y cols. (2011) TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *Journal of dermatological science* 62(1):8-15.
118. Tuchayi SM, y cols. (2015) Acne vulgaris. *Nature Reviews Disease Primers* 1.
119. Skroza N, y cols. (2018) Adult Acne Versus Adolescent Acne: A Retrospective Study of 1,167 Patients. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 11(1):21-25.
120. Chiba K, Yoshizawa K, Makino I, Kawakami K, & Onoue M (2000) Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *J Toxicol Sci* 25(2):77-83.
121. Saint-Leger D, Bague A, Lefebvre E, Cohen E, & Chivot M (1986) A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients. *The British journal of dermatology* 114(5):543-552.
122. Choi CW, Choi JW, Park KC, & Youn SW (2013) Facial sebum affects the development of acne, especially the distribution of inflammatory acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 27(3):301-306.
123. Zouboulis CC, Jourdan E, & Picardo M (2014) Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 28(5):527-532.
124. Tochio T, Tanaka H, Nakata S, & Ikeno H (2009) Accumulation of lipid peroxide in the content of comedones may be involved in the progression of comedogenesis and inflammatory changes in comedones. *Journal of cosmetic dermatology* 8(2):152-158.

125. Selway JL, Kurczab T, Kealey T, & Langlands K (2013) Toll-like receptor 2 activation and comedogenesis: implications for the pathogenesis of acne. *BMC Dermatol* 13:10.
126. Berger EA, McClellan SA, Vistisen KS, & Hazlett LD (2013) HIF-1alpha is essential for effective PMN bacterial killing, antimicrobial peptide production and apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *PLoS Pathog* 9(7):e1003457.
127. Tyner H & Patel R (2015) Hyaluronidase in Clinical Isolates of *Propionibacterium acnes*. *Int J Bacteriol* 2015:218918.
128. Oon HH, y cols. (2019) Acne Management Guidelines by the Dermatological Society of Singapore. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 12(7):34-50.
129. Fox L, Csongradi C, Aucamp M, du Plessis J, & Gerber M (2016) Treatment Modalities for Acne. *Molecules* 21(8).
130. Magin PJ, Adams J, Pond CD, & Smith W (2006) Topical and oral CAM in acne: a review of the empirical evidence and a consideration of its context. *Complementary therapies in medicine* 14(1):62-76.
131. Zeichner JA (2013) Cosmeceuticals for the Treatment of Acne Vulgaris. *Cosmeceuticals and Cosmetic Practice*:209–217.
132. Rathore SP, Gupta S, & Gupta V (2011) Pattern and prevalence of physiological cutaneous changes in pregnancy: a study of 2000 antenatal women. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 77(3):402.
133. Passeron T (2013) Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 27 Suppl 1:5-6.
134. Cario M (2019) How hormones may modulate human skin pigmentation in melasma: An in vitro perspective. *Experimental dermatology* 28(6):709-718.
135. Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, & Shibahara S (1994) Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and cellular biology* 14(12):8058-8070.
136. Kwon SH, Hwang YJ, Lee SK, & Park KC (2016) Heterogeneous Pathology of Melasma and Its Clinical Implications. *International journal of molecular sciences* 17(6).

137. Nomakhosi M & Heidi A (2018) Natural options for management of melasma, a review. *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology* 20(7-8):470-481.
138. Hafner C, y cols. (2009) The absence of BRAF, FGFR3, and PIK3CA mutations differentiates lentigo simplex from melanocytic nevus and solar lentigo. *The Journal of investigative dermatology* 129(11):2730-2735.
139. Arginelli F, y cols. (2019) Efficacy of D-pigment dermocosmetic lightening product for solar lentigo lesions of the hand: A randomized controlled trial. *PLoS One* 14(5):e0214714.
140. Yoon JE, y cols. (2018) Senescent fibroblasts drive ageing pigmentation: A potential therapeutic target for senile lentigo. *Theranostics* 8(17):4620-4632.
141. Kasprzak JM & Xu YG (2015) Diagnosis and management of lentigo maligna: a review. *Drugs Context* 4:212281.
142. Guerrero D (2012) Dermocosmetic management of hyperpigmentations. *Annales de dermatologie et de venereologie* 139 Suppl 4:S166-169.
143. Ortonne JP, Pandya AG, Lui H, & Hexsel D (2006) Treatment of solar lentigines. *Journal of the American Academy of Dermatology* 54(5 Suppl 2):S262-271.
144. Cameli N, Abril E, Agozzino M, & Mariano M (2015) Clinical and instrumental evaluation of the efficacy of a new depigmenting agent containing a combination of a retinoid, a phenolic agent and an antioxidant for the treatment of solar lentigines. *Dermatology* 230(4):360-366.
145. Fowler JF, Jr., Woolery-Lloyd H, Waldorf H, & Saini R (2010) Innovations in natural ingredients and their use in skin care. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 9(6 Suppl):S72-81; quiz s82-73.
146. Vogel CA, Balkrishnan R, Fleischer AB, Cayce KA, & Feldman SR (2004) Over-the-counter topical skin products--a common component of skin disease management. *Cutis* 74(1):55-67.
147. Nolan BV, Levender, M. M, Davis, S. A, Feneran, A. N, Jr, A. B, & Feldman, S. R. (2012) Trends in the use of topical over the counter products in the management of dermatologic disease in the United States. *Dermatology Online Journal* 18(2).
148. Pandey A, Jatana GK, & Sonthalia S (2020) Cosmeceuticals. *StatPearls, Treasure Island (FL))*.

149. Milam EC & Rieder EA (2016) An Approach to Cosmeceuticals. *Journal of drugs in dermatology* : JDD 15(4):452-456.
150. Espinosa-Leal CA & Garcia-Lara S (2019) Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications. *Planta medica* 85(7):535-551.
151. Baron EP (2015) Comprehensive Review of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, and Therapeutic Implications in Medicine and Headache: What a Long Strange Trip It's Been. *Headache* 55(6):885-916.
152. Morales P, Reggio PH, & Jagerovic N (2017) An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol. *Front Pharmacol* 8:422.
153. Ribeiro A, y cols. (2012) Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 678(1-3):78-85.
154. Kozela E, y cols. (2010) Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *The Journal of biological chemistry* 285(3):1616-1626.
155. Casares L, y cols. (2019) Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1. *Redox Biol* 28:101321.
156. Castillo A, Tolon MR, Fernandez-Ruiz J, Romero J, & Martinez-Orgado J (2010) The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 37(2):434-440.
157. Palmieri B, Laurino C, & Vadala M (2019) A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars. *Clin Ter* 170(2):e93-e99.
158. Di Marzo V, Bifulco M, & De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3(9):771-784.
159. Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, & Colleoni M (2004) Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *British journal of pharmacology* 143(2):247-250.

160. Ferro R, y cols. (2018) GPR55 signalling promotes proliferation of pancreatic cancer cells and tumour growth in mice, and its inhibition increases effects of gemcitabine. *Oncogene* 37(49):6368-6382.
161. Russo EB, Burnett A, Hall B, & Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 30(8):1037-1043.
162. Morales P & Reggio PH (2017) An Update on Non-CB₁, Non-CB₂ Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. *Cannabis and cannabinoid research* 2(1):265-273.
163. Xie X, Yoneyama K, & Yoneyama K (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* 48:93-117.
164. Screpanti C, Yoneyama K, & Bouwmeester HJ (2016) Strigolactones and parasitic weed management 50 years after the discovery of the first natural strigolactone strigol: status and outlook. *Pest Manag Sci* 72(11):2013-2015.
165. Pollock CB, y cols. (2014) Strigolactone analogues induce apoptosis through activation of p38 and the stress response pathway in cancer cell lines and in conditionally reprogrammed primary prostate cancer cells. *Oncotarget* 5(6):1683-1698.
166. Mayzlish-Gati E, y cols. (2015) Strigolactone analogs act as new anti-cancer agents in inhibition of breast cancer in xenograft model. *Cancer Biol Ther* 16(11):1682-1688.
167. Croglia MP, y cols. (2016) Analogs of the novel phytohormone, strigolactone, trigger apoptosis and synergize with PARP inhibitors by inducing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Oncotarget* 7(12):13984-14001.
168. Hasan MN, y cols. (2018) Synthetic strigolactone analogues reveal anti-cancer activities on hepatocellular carcinoma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 28(6):1077-1083.
169. Modi S, Yaluri N, Kokkola T, & Laakso M (2017) Plant-derived compounds strigolactone GR24 and pinosylvin activate SIRT1 and enhance glucose uptake in rat skeletal muscle cells. *Sci Rep* 7(1):17606.
170. Modi S, Yaluri N, & Kokkola T (2018) Strigolactone GR24 and pinosylvin attenuate adipogenesis and inflammation of white adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 499(2):164-169.
171. Bolger AM, Lohse M, & Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-2120.

172. Kim D, Langmead B, & Salzberg SL (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12(4):357-360.
173. Liao Y, Smyth GK, & Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7):923-930.
174. Love MI, Huber W, & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15(12):550.
175. Bairoch A & Apweiler R (1996) The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TrEMBL. *Nucleic acids research* 24(1):21-25.
176. Kuleshov MV, y cols. (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research* 44(W1):W90-97.
177. Ashburner M, y cols. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25(1):25-29.
178. Pico AR, y cols. (2008) WikiPathways: pathway editing for the people. *PLoS Biol* 6(7):e184.
179. Khan A, y cols. (2018) JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic acids research* 46(D1):D1284.
180. Korotkevich G, Sukhov V, & Sergushichev A (2019) Fast Gene Set Enrichment Analysis.
181. Benjamini Y. HY (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 57(1):289-300.
182. Edgar R, Domrachev M, & Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research* 30(1):207-210.
183. Vizcaino JA, y cols. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* 32(3):223-226.
184. Perez-Riverol Y, y cols. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic acids research* 47(D1):D442-D450.
185. Miyai M, y cols. (2016) Transcription Factor MafB Coordinates Epidermal Keratinocyte Differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 136(9):1848-1857.

186. Fu KL, y cols. (2016) Chemical constituents of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and their antioxidant activities. *Fitoterapia* 113:110-116.
187. Rameshk M, y cols. (2018) Proliferation and In Vitro Wound Healing Effects of the Microniosomes Containing *Narcissus tazetta* L. Bulb Extract on Primary Human Fibroblasts (HDFs). *Daru*.
188. Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, & Lafrenie RM (2010) *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF-alpha inhibitor through NF-kappaB. *Journal of ethnopharmacology* 127(3):685-693.
189. Ccahuana-Vasquez RA, Santos SS, Koga-Ito CY, & Jorge AO (2007) Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res* 21(1):46-50.
190. Azevedo B, y cols. (2019) Antioxidant Activity of an Aqueous Leaf Extract from *Uncaria tomentosa* and Its Major Alkaloids Mitraphylline and Isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* 24(18).
191. El Azhary K, y cols. (2017) Anti-inflammatory potential of *Capparis spinosa* L. in vivo in mice through inhibition of cell infiltration and cytokine gene expression. *BMC Complement Altern Med* 17(1):81.
192. Yu L, y cols. (2017) Antioxidant and antitumor activities of *Capparis spinosa* L. and the related mechanisms. *Oncology reports* 37(1):357-367.
193. Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, & Tominaga M (2007) Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *The Journal of investigative dermatology* 127(3):654-659.
194. Peyssonnaud C, y cols. (2008) Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection. *The Journal of investigative dermatology* 128(8):1964-1968.
195. Rius J, y cols. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453(7196):807-811.
196. Elmets CA, y cols. (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44(3):425-432.
197. Kapoor M, Howard R, Hall I, & Appleton I (2004) Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am J Pathol* 165(1):299-307.

198. Christensen LP (2009) Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 55:1-99.
199. Oh Y, Lim HW, Kim K, & Lim CJ (2016) Ginsenoside Re improves skin barrier function in HaCaT keratinocytes under normal growth conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 80(11):2165-2167.
200. Lee JO, y cols. (2018) Antimelanogenesis and skin-protective activities of Panax ginseng calyx ethanol extract. *Journal of ginseng research* 42(3):389-399.
201. Bandarra D, Biddlestone J, Mudie S, Muller HA, & Rocha S (2015) HIF-1 α restricts NF-kappaB-dependent gene expression to control innate immunity signals. *Dis Model Mech* 8(2):169-181.
202. Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, & Kim SY (2014) Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *Journal of medicinal food* 17(9):985-995.
203. Park G, y cols. (2012) Coriandrum sativum L. protects human keratinocytes from oxidative stress by regulating oxidative defense systems. *Skin Pharmacol Physiol* 25(2):93-99.
204. Wu TT, y cols. (2010) Suppressive effects of extracts from the aerial part of Coriandrum sativum L. on LPS-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *J Sci Food Agric* 90(11):1846-1854.
205. Casetti F, y cols. (2012) Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from Coriandrum sativum L. fruits. *Phytother Res* 26(3):420-424.
206. Ku CS & Mun SP (2008) Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from Pinus radiata bark. *Wood Science and Technology* 42(1):47-60.
207. Choi YH, Song CH, & Mun SP (2018) Proanthocyanidin-rich Pinus radiata bark extract inhibits mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions. *Phytother Res* 32(2):290-297.
208. Rubsam ML, Esch M, Baum E, & Bosner S (2015) Diagnosing skin disease in primary care: a qualitative study of GPs' approaches. *Family practice* 32(5):591-595.
209. Tabassum N & Hamdani M (2014) Plants used to treat skin diseases. *Pharmacognosy reviews* 8(15):52-60.

210. Cizauskaite U & Bernatoniene J (2018) Innovative Natural Ingredients-Based Multiple Emulsions: The Effect on Human Skin Moisture, Sebum Content, Pore Size and Pigmentation. *Molecules* 23(6).
211. Syed TA, y cols. (1996) Management of psoriasis with Aloe vera extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled, double-blind study. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 1(4):505-509.
212. Teplicki E, y cols. (2018) The Effects of Aloe vera on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds : a compendium of clinical research and practice* 30(9):263-268.
213. Hashemi SA, Madani SA, & Abediankenari S (2015) The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. *BioMed research international* 2015:714216.
214. Rodrigues D, y cols. (2016) Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 15(3):334-350.
215. Borchardt JK (2002) The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News Perspect* 15(3):187-192.
216. Popko L (2018) Some Notes on Papyrus Ebers, Ancient Egyptian Treatments of Migraine, and a Crocodile on the Patient's Head. *Bull Hist Med* 92(2):352-366.
217. Shenefelt PD (2011) Herbal Treatment for Dermatologic Disorders. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, eds nd, Benzie IFF, & Wachtel-Galor SBoca Raton (FL)).
218. Corson TW & Crews CM (2007) Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* 130(5):769-774.
219. Kaiser H (2008) [From the plant to chemistry--the early history of "rheumatic medication"]. *Z Rheumatol* 67(3):252-262.
220. De Marino S, y cols. (2008) Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules* 13(6):1219-1229.
221. Roumy V, y cols. (2015) In vitro Antimicrobial Activity of Traditional Plant Used in Mestizo Shamanism from the Peruvian Amazon in Case of Infectious Diseases. *Pharmacogn Mag* 11(Suppl 4):S625-633.

222. Jones K (2003) Review of sangre de drago (*Croton lechleri*)--a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *J Altern Complement Med* 9(6):877-896.
223. Risco E, y cols. (2003) Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. *Planta medica* 69(9):785-794.
224. Williams JE (2001) Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. *Altern Med Rev* 6(6):567-579.
225. Namjoyan F, Kiashi F, Moosavi ZB, Saffari F, & Makhmalzadeh BS (2016) Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Tradit Complement Med* 6(1):37-40.
226. Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, & Fan C (2019) Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019:2684108.
227. Ratz-Lyko A, Arct J, & Pytkowska K (2016) Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing *Centella asiatica* Extract. *Indian J Pharm Sci* 78(1):27-33.
228. George M, Joseph L, & Ramaswamy (2009) Anti-allergic, anti-pruritic, and anti-inflammatory activities of *Centella asiatica* extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 6(4):554-559.
229. Ben Yehuda Greenwald M, y cols. (2017) Curcumin Protects Skin against UVB-Induced Cytotoxicity via the Keap1-Nrf2 Pathway: The Use of a Microemulsion Delivery System. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017:5205471.
230. He Y, y cols. (2015) Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules* 20(5):9183-9213.
231. Moghadamtousi SZ, y cols. (2014) A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed research international* 2014:186864.
232. Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, & Devasagayam TP (2007) Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr* 40(3):163-173.
233. Abaci HE, Guo Z, Doucet Y, Jackow J, & Christiano A (2017) Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. *Experimental biology and medicine* 242(17):1657-1668.

234. Tarassoli SP, y cols. (2018) Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 71(5):615-623.
235. Zhang X, y cols. (2018) Bach1: Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018:1347969.
236. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, & Bach FH (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology* 24(8):449-455.
237. Suzuki H, y cols. (2004) Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *The EMBO journal* 23(13):2544-2553.
238. Reichard JF, Motz GT, & Puga A (2007) Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic acids research* 35(21):7074-7086.
239. Ichimura Y, y cols. (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular cell* 51(5):618-631.
240. Jain A, y cols. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 285(29):22576-22591.
241. Shao Y, He T, Fisher GJ, Voorhees JJ, & Quan T (2017) Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *International journal of cosmetic science* 39(1):56-65.
242. Limandjaja GC, y cols. (2017) Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars. *The British journal of dermatology* 176(1):116-126.
243. Ogawa E, Sato Y, Minagawa A, & Okuyama R (2018) Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *The Journal of dermatology* 45(3):264-272.
244. Jarocka-Karpowicz I, Biernacki M, Wronski A, Gegotek A, & Skrzydlewska E (2020) Cannabidiol Effects on Phospholipid Metabolism in Keratinocytes from Patients with Psoriasis Vulgaris. *Biomolecules* 10(3).
245. Jastrzab A, Gegotek A, & Skrzydlewska E (2019) Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells* 8(8).

246. Olah A, y cols. (2014) Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *The Journal of clinical investigation* 124(9):3713-3724.
247. Kosgodage US, y cols. (2019) Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9:324.
248. Rogati F, y cols. (2019) Identification of a Strigoterpenoid with Dual Nrf2 and Nf-kappaB Modulatory Activity. *ACS Med Chem Lett* 10(4):606-610.
249. Sung YY & Kim HK (2018) Crocin Ameliorates Atopic Dermatitis Symptoms by down Regulation of Th2 Response via Blocking of NF-kappaB/STAT6 Signaling Pathways in Mice. *Nutrients* 10(11).
250. Gamble C, y cols. (2012) Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *British journal of pharmacology* 165(4):802-819.
251. Kameoka H & Kyozuka J (2018) Spatial regulation of strigolactone function. *Journal of experimental botany* 69(9):2255-2264.
252. Choi YY, Kim MH, Lee H, Jo SY, & Yang WM (2018) (R)-(+)-pulegone suppresses allergic and inflammation responses on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice model. *Journal of dermatological science* 91(3):292-300.
253. Furst R (2016) Narciclasine - an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta medica* 82(16):1389-1394.
254. Hatano Y, y cols. (2010) Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allergy Clin Immunol* 125(1):160-169 e161-165.
255. Jung Y, y cols. (2018) Eupatilin, an activator of PPARalpha, inhibits the development of oxazolone-induced atopic dermatitis symptoms in Balb/c mice. *Biochemical and biophysical research communications* 496(2):508-514.
256. Navarro-Hoyos M, Alvarado-Corella D, Moreira-Gonzalez I, Arnaez-Serrano E, & Monagas-Juan M (2018) Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Uncaria tomentosa* Bark and Leaves. *Antioxidants* 7(5).
257. Cabanillas B & Novak N (2016) Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol* 42:1-8.
258. Yamada K, Matsushita K, Wang J, & Kanekura T (2018) Topical Glucose Induces Claudin-1 and Filaggrin Expression in a Mouse Model of Atopic

- Dermatitis and in Keratinocyte Culture, Exerting Anti-inflammatory Effects by Repairing Skin Barrier Function. *Acta dermato-venereologica* 98(1):19-25.
259. Lee YW, y cols. (2019) Efficacy and safety of PAC-14028 cream - a novel, topical, nonsteroidal, selective TRPV1 antagonist in patients with mild-to-moderate atopic dermatitis: a phase IIb randomized trial. *The British journal of dermatology* 180(5):1030-1038.
 260. Olah Z, y cols. (2017) Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 34:44-49.
 261. Terada Y, y cols. (2014) Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by voacangine, an alkaloid present in *Voacanga africana*, an African tree. *Journal of natural products* 77(2):285-297.
 262. Ottaviani M, y cols. (2006) Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 126(11):2430-2437.
 263. Weber N, y cols. (2019) Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules* 24(2).
 264. Poomanee W, y cols. (2018) In-vitro investigation of anti-acne properties of *Mangifera indica* L. kernel extract and its mechanism of action against *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe* 52:64-74.
 265. Jin S & Lee MY (2018) *Kaempferia parviflora* Extract as a Potential Anti-Acne Agent with Anti-Inflammatory, Sebostatic and Anti-*Propionibacterium acnes* Activity. *International journal of molecular sciences* 19(11).
 266. Byun EB, Kim WS, Sung NY, & Byun EH (2018) Epigallocatechin-3-Gallate Regulates Anti-Inflammatory Action Through 67-kDa Laminin Receptor-Mediated Tollip Signaling Induction in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Intestinal Epithelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46(5):2072-2081.
 267. Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M, & Nakamura Y (2016) Anti-inflammatory Action of Green Tea. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry* 15(2):74-90.

268. Okumura CY, y cols. (2012) A new pharmacological agent (AKB-4924) stabilizes hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and increases skin innate defenses against bacterial infection. *Journal of molecular medicine* 90(9):1079-1089.
269. Yoon JY, Kwon HH, Min SU, Thiboutot DM, & Suh DH (2013) Epigallocatechin-3-gallate improves acne in humans by modulating intracellular molecular targets and inhibiting *P. acnes*. *The Journal of investigative dermatology* 133(2):429-440.
270. Zhang Q, y cols. (2006) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 α protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 5(5):1227-1238.
271. Liao ZH, y cols. (2020) The epigallocatechin gallate derivative Y6 inhibits human hepatocellular carcinoma by inhibiting angiogenesis in MAPK/ERK1/2 and PI3K/AKT/ HIF-1 α /VEGF dependent pathways. *Journal of ethnopharmacology* 259:112852.
272. Zhu Z, Wang Y, Liu Z, Wang F, & Zhao Q (2012) Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate on cell proliferation and the expression of HIF-1 α and P-gp in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Oncology reports* 27(5):1567-1572.
273. Thomas R & Kim MH (2005) Epigallocatechin gallate inhibits HIF-1 α degradation in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 334(2):543-548.
274. Liu C, Bae KH, Yamashita A, Chung JE, & Kurisawa M (2017) Thiol-Mediated Synthesis of Hyaluronic Acid-Epigallocatechin-3-O-Gallate Conjugates for the Formation of Injectable Hydrogels with Free Radical Scavenging Property and Degradation Resistance. *Biomacromolecules* 18(10):3143-3155.
275. Puhvel SM & Reisner RM (1972) The production of hyaluronidase (hyaluronate lyase) by *Corynebacterium acnes*. *The Journal of investigative dermatology* 58(2):66-70.
276. Lin D, Wang SH, Song TY, Hsieh CW, & Tsai MS (2019) Safety and efficacy of tyrosinase inhibition of *Paeonia suffruticosa* Andrews extracts on human melanoma cells. *Journal of cosmetic dermatology* 18(6):1921-1929.

277. Wu L, y cols. (2018) Evaluation of Tyrosinase Inhibitory, Antioxidant, Antimicrobial, and Antiaging Activities of *Magnolia officinalis* Extracts after *Aspergillus niger* Fermentation. *BioMed research international* 2018:5201786.
278. Kim TY (2020) Autophagy Induction Can Regulate Skin Pigmentation by Causing Melanosome Degradation in Keratinocytes and Melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 33(3):403-415.

VII. Anexos

Anexo I
Publicaciones Científicas

Identification of a Strigoterpenoid with Dual Nrf2 and NF- κ B Modulatory Activity

Federica Rogati,^{†,‡} Estrella Millán,^{¶,⊥,‡} Giovanni Appendino,[†] Alejandro Correa,^{¶,⊥,‡} Diego Caprioglio,[†] Alberto Minassi,^{*,†,⊙} and Eduardo Muñoz^{*,¶,⊥,‡}

[†]Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale, Via Bovio 6, Novara 28100, Italy

[¶]Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba, Avda Menendez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

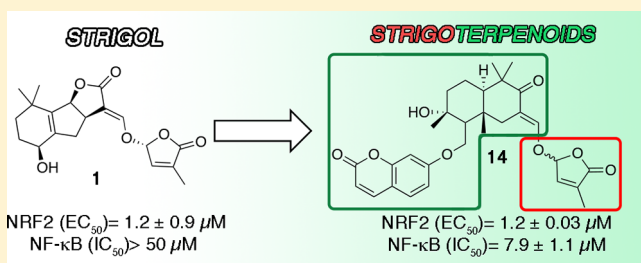
[⊥]Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Avda Menendez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

[⊙]University Hospital Reina Sofia, Avda Menendez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: The sesquiterpene–coumarin ether samarcan-done provided a suitable framework to replace the apocarotenoid A–C ring system of strigol (1), replicating, after linking to a butenolide moiety, the activity of the natural phytohormone on Nrf2 and also showing potent NF- κ B inhibitory activity, overall modulating two critical pathways of inflammation and cancer.

KEYWORDS: Strigolactones, terpenes, Nrf2, NF- κ B



Small-molecule endogenous hormones modulate basic plant functions like growth, differentiation, and reproduction as well as their response to abiotic- and biotic stress. Ethylene was the first member of this structurally heterogeneous class to be identified, and the inventory has then significantly expanded to include as major members indoleacetic and abscisic acids, brassinosteroids, cytokinins, gibberellins, jasmonoids, salicylic acid, and strigolactones (SLs). In addition to their role in plant physiology, certain plant hormones can also bind mammalian targets, or even be produced by mammalian cells, as exemplified by abscisic acid.¹ Furthermore, plant hormones can also serve as a scaffold for drug discovery, as shown by aspirin and, more recently, by the cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine, whose structure was inspired by cytokinins, a class of *N*⁶-substituted adenine derivatives.² Despite these interesting clues, the potential of plant hormones to serve a lead structure for drug discovery has not yet been systematically evaluated. This gap has provided a rationale to explore the potential of strigolactones (SLs), the most recent addition to the plant hormone inventory, to modulate mammalian targets of medical relevance.

Strigolactones (SLs) are C15 apocarotenoid dilactones involved in shoot- and root architecture and in plant responses to environmental stress. Strigol (1), the first member of this family, was isolated in 1966, and the inventory of strigolactonoids now includes more than 15 additional analogues. SLs are characterized by a tricyclic scaffold linked to a butenolide D ring by an enolic oxymethine. There is convincing evidence that the reactive CD ring system is

responsible for the plant hormone activity of SLs, which is mediated by covalent binding to a reactive cysteine residue in their macromolecular targets.³ Synthetic and natural SLs have been extensively investigated as germination stimulants of parasitic weed seeds as well as biopesticides for crop protection,⁴ but only limited knowledge exist on their involvement in animal cell function and their potential cross-kingdom activity, despite promising results in the realm of anticancer drug discovery.⁵ Within the possible mammalian targets of SLs, the transcription factor Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) seemed of particular relevance because of its sensitivity to nucleophilic trapping and its role in the regulation of many cytoprotective enzymes involved in the adaptive oxidative stress response.⁶ Nrf2 is the target of dimethyl fumarate, a compound used in the management of multiple sclerosis,⁷ and of bardoxolone methyl, currently under phase III clinical study for the management of pulmonary hypertension.⁸

In the event, strigolactone (1) turned out to be a potent activator of the Nrf2 pathway (EC₅₀ = 1.2 ± 0.9 μM), providing a rationale for investigating the structure–activity relationship of this chemotype. Strigol and SLs in general have a very limited availability, and we therefore attempted to

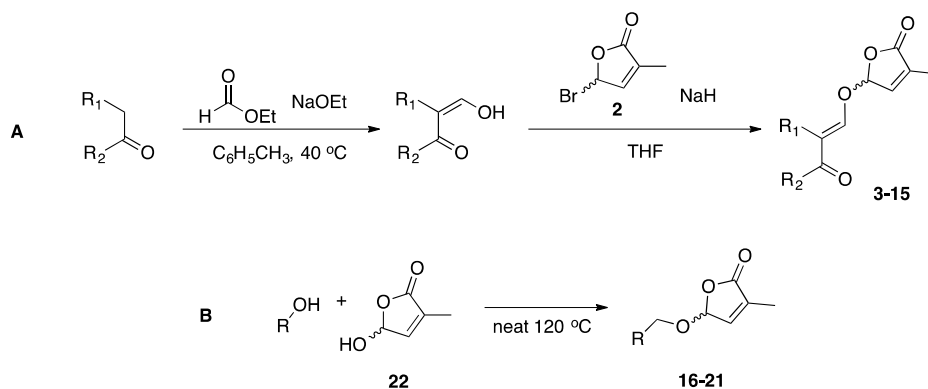
Special Issue: Highlighting Medicinal Chemistry in Italy

Received: November 30, 2018

Accepted: January 8, 2019

Published: January 8, 2019

Table 1. Synthesis of Homoterpeno-strigoids (A) and Terpenostrigoids (B)



	Compound	Yield (%)	NRF2 (EC ₅₀) ^a	NF-κB (IC ₅₀) ^b
3		70	>50	>50
4		51	>50	>50
5		65	>50	>50
6		73	>50	>50
7		44	>50	>50
8		28	>50	>50
9		56	>50	>50

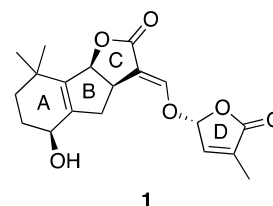
Table 1. continued

	Compound	Yield (%)	NRF2 (EC ₅₀) ^a	NF-κB (IC ₅₀) ^b
10		68	17.8 ± 1.7	>50
11		64	1.6 ± 0.3	>50
12		66	5 ± 0.2	>50
13		37	1.9 ± 0.6	>50
14		48	1.2 ± 0.03	7.9 ± 1.1
15		26	2.5 ± 0.2	N.D.
16		20	29.5 ± 6.4	>50
17		31	16.2 ± 2.3	>50
18		24	22.8 ± 3.4	>50
19		28	26.3 ± 4	>50
20		44	16.3 ± 2.7	>50
21		14	15.5 ± 1.9	>50

^aStrigol (1) EC₅₀: NRF2 (EC₅₀) 1.2 ± 0.9; ^bNF-κB (IC₅₀) > 50.

identify a surrogate of the apocarotenoid A–C ring system of the natural hormone within more easily available isoprenoids. To this purpose, analogues where ring D is implanted in various isoprenoids scaffolds were designed. Two series of analogues were prepared, differing for the way ring D and the isoprenoid core are linked (oxymethine- or oxygen tether), and all compounds were then comparatively evaluated with strigol (1) for their capacity to modulate the activity of Nrf2. All compounds were also investigated for their capacity to inhibit NF-κB, another transcription factor sensitive to electrophilic modulation. Although strigol was inactive in this assay, dual modulators of Nrf2 and NF-κB hold great pharmacological

potential,^{7,8} and we hope to discover compounds with this bioactivity profile.



Compounds with an oxymethine tethered were built by Claisen formylation of an isoprenoid ketone and then coupling with the bromofuranone 2 (Table 1). The reaction was stereoselective regarding the configuration of the oxymethine

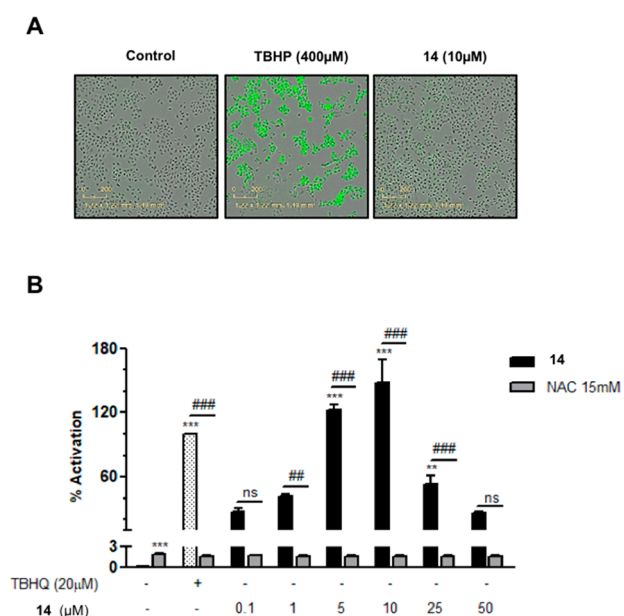


Figure 1. Compound **14** activates Nrf2 without inducing ROS. (A) ROS production in HaCaT cells. Images were obtained after 3 h of treatment. (B) Nrf2 transcription activity was analyzed in HaCaT-ARE-Luc. Cells were treated with **14** in absence or presence of NAC (15 mM) at the doses indicated during 6 h.

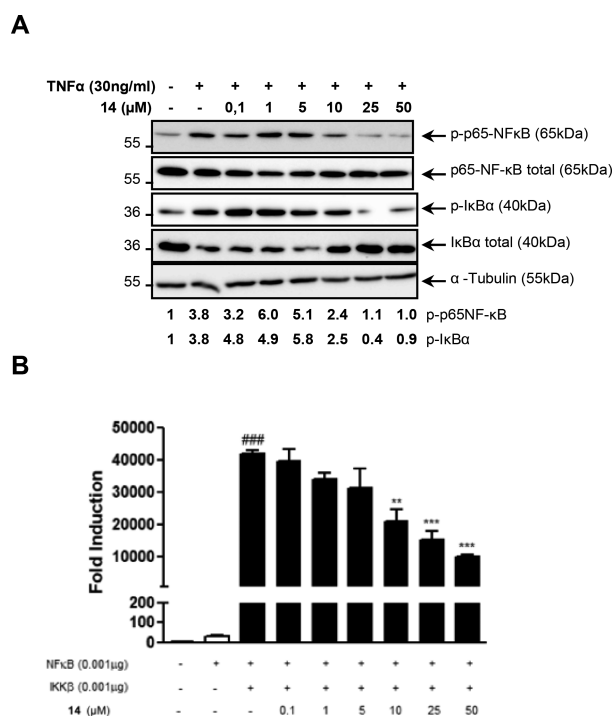


Figure 2. Effects of **14** on NF-κB activation. (A) Levels of NF-κB proteins expression and phosphorylation by immunoblot. (B) IKKβ-induced NF-κB activation is inhibited by **14**.

linker, with the predictable exclusive formation of the *E*-isomer, evident from the downfield shift of the oxymethine (δ ca. 7.40), diagnostic of a *syn*-relationship with the carbonyl. Thus, the nucleophilic displacement reaction occurred with formal inversion of configuration of the enol double bond, which was in the intramolecularly hydrogen-bonded *Z*-configuration in the starting enol (compounds **B**, Table 1).

In all cases, an almost equimolecular mixture of isomers at the furanone C-5 carbon was, however, obtained. The diastereomeric mixture was difficult to separate, and all compounds were assayed as such.

The strigoids obtained from pentacyclic triterpene ketones (**3–9**) were totally devoid of activity, suggesting that the isoprenoid scaffold was too large to access the site hosting the reactive thiol group of Nrf2, and similar results were observed for the inhibition of NF-κB. However, bicyclic and monocyclic isoprenoid ketones afforded active strigoids, some of which showed potency similar to strigol, with EC_{50} in the one-digit micromolar range (Table 1). Within *p*-menthane derivatives, the cross-conjugated dienones **11** and **12**, obtained from, respectively, carvone and pulegone, were significantly more potent than the enone **10**, derived from menthone ($EC_{50} = 1.6 \pm 0.3 \mu M$ and $5 \pm 0.2 \mu M$ vs $17.8 \pm 1.7 \mu M$, respectively), suggesting that electronic factors are important for activity. Also **13**, derived from α -thujone, was significantly active ($EC_{50} = 1.9 \pm 0.6 \mu M$), and one-digit micromolar activity was also retained in the bicyclic strigoids **14** ($EC_{50} = 1.2 \pm 0.03 \mu M$), and **15** ($EC_{50} = 2.5 \pm 0.2 \mu M$), derived, respectively, from the sesquiterpene coumarin ether samarandone and the triterpenoid mirranone **B**.

The second series of terpenostrigoids was obtained by condensing the butenolide lactol **22** with a series of isoprenoid alcohols according to the Feringa protocol (heating at 120 °C in the absence of solvent)⁹ (Table 1). Also in this case, the reaction gave a mixture of diastereomeric furanones (**16–21**) that were assayed as such. Overall, the oxygen-tethered terpenostrigoids were one order of magnitude less potent than the oxymethine-linked homoterpenostrigoids.

Strigol (**1**) could activate Nrf2, but had no effect on TNFα-induced NF-κB activation, another upstream regulatory process sensitive to thiol trapping that critically relies on the presence of cysteine as an on/off switch. This profile was replicated by all active compounds we identified with the exception of the bicyclic drimane coumarin ether **14**, that could, surprisingly, also inhibit NF-κB activity at low μM concentrations ($IC_{50} = 7.9 \mu M$). This dual profile of activity is interesting, and was further investigated. We first clarified the Nrf2 activation mechanism, which can be electrophilic (direct thiol trapping) or oxidative (oxidation of the cysteine sulfur atom) and mediated by reactive oxygen species (ROS). To this purpose, we investigated the relationship between the induction of Nrf2 activity and the increase of cellular ROS. Figure 1A shows that, in contrast to *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), **14** was unable to affect the intracellular levels of ROS. Interestingly, pretreatment with *N*-acetyl cysteine (NAC) inhibited the activity of **14** on Nrf2 activation (Figure 1B). NAC is a scavenger of oxygen free radicals and a precursor of L-cysteine. Since **14** was not able to induce ROS, NAC might react with its coumarin moiety, which has Michael-acceptor properties,¹⁰ to generate an inactive adduct.

Next, we investigated the effect of **14** on the canonical pathway of NF-κB activation by analyzing the steady-state levels of phosphorylated IκBα and p65 (a subunit of the more common form of NF-κB heterodimers). Both IκBα and p65 proteins are phosphorylated by the IκB kinase β (IKKβ), which is activated by TNFα through the so-called canonical pathway. The drimane strigoid **7** clearly inhibited the phosphorylation of both IκBα and p65 induced by TNFα in NIH-3T3-KBF-Luc cells. Phosphorylation of IκBα is required for its degradation,

and we found that **14** could also prevent TNF α -induced I κ B α degradation (Figure 2A).

Furthermore, **14** could also inhibit specifically the NF- κ B activation induced by overexpression of IKK β (Figure 2B). Taken together, these observations suggest that **14** could directly interact with the Cys-179 of this kinase and inhibit its activity.

In conclusion, we have identified a sesquiterpene-coumarin strigoid (**14**) that not only replicates the activity of natural strigol (**1**) on the activation of Nrf2, but also targets the NF- κ B pro-inflammatory pathway. Within terpeno-strigoids, the activation of Nrf2 was sensitive to the size of the isoprenoid moiety, tolerating mono- and bicyclic systems but not more complex polycyclic constructs, while the inhibition of NF- κ B was specific of **14**. The cross-talk between inflammation and the oxidative response plays an important role in cancer, and compounds capable to modulate both pathways are interesting leads to prevent and treat malignancies, qualifying **14** for further studies.¹¹

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00604.

Materials and methods; original spectroscopic data for the novel compounds (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +39 0321375843. E-mail: alberto.minassi@uniupo.it (A.M.).

*Phone: +34 957213766. E-mail: f1muble@uco.es (E.M.).

ORCID

Alberto Minassi: 0000-0002-3640-2912

Author Contributions

[‡]These authors contributed equally. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Zocchi, E.; Hontecillas, R.; Leber, A.; Einerhand, A.; Carbo, A.; Bruzzzone, S.; Tubau-Juni, N.; Philipson, N.; Zoccoli-Rodriguez, V.; Sturia, L.; Bassaganya-Riera, J. Abscissic Acid: A Novel Nutraceutical for Glycemic Control. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 24.
- (2) Meijer, L.; Raymond, E. Roscovitine and Other Purines as Kinase Inhibitors. From Starfish Oocytes to Clinical Trials. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 417–425.
- (3) de Saint Germain, A.; Clavé, G.; Badet-Denisot, M. A.; Pillot, J. P.; Cornu, D.; Le Caer, J. P.; Burger, M.; Pelissier, F.; Retailleau, P.; Turnbull, C.; Bonhomme, S.; Chory, J.; Rameau, C.; Boyer, F. D. An histidine covalent receptor and butenolide complex mediates strigolactone perception. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 787–794.
- (4) Screpanti, C.; Yoneyama, K.; Bouwmeester, H. J. Strigolactones and parasitic weed management 50 years after the discovery of the first natural strigolactone strigol: status and outlook. *Pest Manage. Sci.* **2016**, *72*, 2013–2015.
- (5) Pollock, C. B.; Koltai, H.; Kapulnik, Y.; Prandi, C.; Yarden, R. I. Strigolactones: a novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *134*, 1041–55.

(6) Cuadrado, A.; Manda, G.; Hassan, A.; Alcaraz, M. J.; Barbas, C.; Daiber, A.; Ghezzi, P.; León, R.; López, M. G.; Oliva, B.; Pajares, M.; Rojo, A. I.; Robledinos-Antón, N.; Valverde, A. M.; Guney, E.; Schmidt, H. H. W. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 348–383.

(7) Montes Diaz, G.; Hupperts, R.; Fraussen, J.; Somers, V. Dimethyl fumarate treatment in multiple sclerosis: Recent advances in clinical and immunological studies. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 1240–1250.

(8) Cheng, Y.; Gong, Y.; Qian, S.; Mou, Y.; Li, H.; Chen, X.; Kong, H.; Xie, W.; Wang, H.; Zhang, Y.; Huang, Z. Identification of a Novel Hybridization from Isosorbide 5-Mononitrate and Bardoxolone Methyl with Dual Activities of Pulmonary Vasodilation and Vascular Remodeling Inhibition on Pulmonary Arterial Hypertension Rats. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1474–1482.

(9) Feringa, B. L.; De Lange, B.; De Jong, J. C. Synthesis of enantiomerically pure gamma-(menthyloxy)butenolides and (R)- and (S)-2-methyl-1,4-butanediol. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2471–2475.

(10) Avonto, C.; Taglialatela-Scafati, O.; Pollastro, F.; Minassi, A.; Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Appendino, G. An NMR spectroscopic method to identify and classify thiol-trapping agents: revival of Michael acceptors for drug discovery? *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 467–471.

(11) Khurana, N.; Sikka, S. C. Targeting Crosstalk between Nrf-2, NF- κ B and Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Cancers* **2018**, *10*, 352.



Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1

Laura Casares^{a,1}, Víctor García^{b,c,1}, Martín Garrido-Rodríguez^{b,c}, Estrella Millán^b, Juan A. Collado^{b,c}, Adela García-Martín^d, Jon Peñarando^d, Marco A. Calzado^{c,e,f}, Laureano de la Vega^{a,**}, Eduardo Muñoz^{c,e,f,*}

^a Jacqui Wood Cancer Centre, Division of Cellular Medicine, School of Medicine, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

^b Innohealth Group, Madrid, Spain

^c Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

^d Emerald Health Biotechnology, Córdoba, Spain

^e Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Spain

^f Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Cannabidiol/ BACH1/ HMOX1/ NRF2/
Keratinocytes

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a major non-psychotropic phytocannabinoid that attracted a great attention for its therapeutic potential against different pathologies including skin diseases. However, although the efficacy in pre-clinical models and the clinical benefits of CBD in humans have been extensively demonstrated, the molecular mechanism(s) and targets responsible for these effects are as yet unknown. Herein we characterized at the molecular level the effects of CBD on primary human keratinocytes using a combination of RNA sequencing (RNA-Seq) and sequential window acquisition of all theoretical mass spectrometry (SWATH-MS). Functional analysis revealed that CBD regulated pathways involved in keratinocyte differentiation, skin development and epidermal cell differentiation among other processes. In addition, CBD induced the expression of several NRF2 target genes, with heme oxygenase 1 (HMOX1) being the gene and the protein most upregulated by CBD. CRISPR/Cas9-mediated genome editing, RNA interference and biochemical studies demonstrated that the induction of *HMOX1* mediated by CBD, involved nuclear export and proteasomal degradation of the transcriptional repressor BACH1. Notably, we showed that the effect of BACH1 on *HMOX1* expression in keratinocytes is independent of NRF2. *In vivo* studies showed that topical CBD increased the levels of HMOX1 and of the proliferation and wound-repair associated keratins 16 and 17 in the skin of mice. Altogether, our study identifies BACH1 as a molecular target for CBD in keratinocytes and sets the basis for the use of topical CBD for the treatment of different skin diseases including atopic dermatitis and keratin disorders.

1. Introduction

The skin serves as a protective barrier against the environment and is constantly exposed to insults which can lead to the generation of reactive oxygen species (ROS). While low levels of ROS act as intracellular signalling messengers [1], high ROS levels lead to oxidative stress, which is deleterious, as it damages cellular macromolecules [2]. Oxidative stress-induced cell damage can lead to chronic inflammation and is involved in the pathogenesis of skin diseases, skin disorder and skin aging [3]. To counteract the harmful accumulation of ROS, healthy

skin presents a battery of defence mechanisms including antioxidant and detoxification systems. Many of these systems are under the control of nuclear factor erythroid 2-like 2 (NRF2), the master regulator of the antioxidant responses. Under basal conditions, NRF2 is kept at low levels by the negative regulator KEAP1 [4,5], a substrate adaptor protein for the Cullin3-containing E3-ligase complex, that mediates NRF2 ubiquitination and subsequent degradation. Cell exposure to ROS or electrophiles impairs the NRF2-KEAP1 binding, leading to NRF2 stabilisation [6]. NRF2 then can translocate to the nucleus where it binds to antioxidant response elements (AREs) in the promoters of NRF2 target

* Corresponding author. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba, Spain

** Corresponding Author. Jacqui Wood Cancer Centre, Division of Cellular Medicine, School of Medicine, University of Dundee, UK
E-mail addresses: l.delavega@dundee.ac.uk (L. de la Vega), filmmuble@uco.es (E. Muñoz).

¹ These authors contributed equally to this work.

genes and activate their expression [7].

Among NRF2 target genes is the stress inducible enzyme HMOX1. This enzyme catalyses the rate-limiting reaction in heme catabolism and has important antioxidant and anti-inflammatory properties [8,9]. Due to these cytoprotective properties, *HMOX1* is highly induced by a variety of cellular stresses [10] (e.g. oxidative stress, UV irradiation, hydrogen peroxide, nitric oxide, heavy metals, phorbol esters, lipopolysaccharide and organic chemicals) and thus it is one of the more widely used markers for stress responses. Although *HMOX1* is positively regulated by NRF2, its expression is also negatively regulated by the transcription factor BTB And CNC Homology 1 (BACH1) [11,12]. Importantly, the primary event leading to *HMOX1* induction is the deactivation of BACH1 repression [13]. The current model postulates that BACH1 and NRF2 act together to control *HMOX1* expression with the negative effect of BACH1 being dominant over the positive effect of NRF2; thus, BACH1 must be displaced for NRF2 to access the *HMOX1* promoter and to induce its expression. Although *HMOX1* is the main and the best characterized BACH1 target gene, a subset of NRF2 target genes have also been suggested to be BACH1 target genes (i.e. *GCLC* and *SQSTM1*) [14,15]. In normal skin *HMOX1* is expressed in the upper epidermis, with the most prominent *HMOX1* expression in the granular layer [16]. Furthermore, *HMOX1* expression is associated with keratinocytes differentiation, and it is expressed in differentiated keratinocytes [16].

Cannabidiol (CBD) is the best studied non-psychotropic phyto-cannabinoid and shows pleiotropic activities including antioxidant and anti-inflammatory effects [17–20]. Based on these properties, CBD might have therapeutic utility in a number of conditions including skin disorders. Additionally, it has been suggested that cannabinoids can be an attractive therapeutic approach for the treatment of keratin disorder such as epidermolysis bullosa (EB), a rare genodermatoses caused by function-impairing mutations in keratins [21]. Interestingly a recent observational study using self-initiated topical CBD use in 3 patients with EB reported faster wound healing, less blistering, and amelioration of pain in all patients [22].

Previous reports have shown that in cell types other than skin cells, CBD induced the expression of *HMOX1* and other NRF2-dependent genes [23,24], however, the mechanism of action behind the effect of CBD on the NRF2 pathway is not known. In addition, to date no systematic analysis of the pathways regulated by CBD in keratinocytes has been performed. Herein we show for the first time that CBD is a BACH1 inhibitor and a weak NRF2 activator. Furthermore, we reveal that in keratinocytes, *HMOX1* expression is regulated by BACH1 in a NRF2-independent manner. Finally, we show that topical CBD application in mice increased the levels of *HMOX1* in the epidermis (in agreement with our results in cells) and induced the expression of wound-repair and proliferation associated keratins 16 and 17.

2. Experimental procedures

2.1. Cell cultures

Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) and Keratinocyte growth medium were purchased to Innoprot SL (Biscaia, Spain). The cells were cultured until confluence in 60 cm² plates with medium change every 24–48 h. Then, the cells were cultured in fresh medium in the presence or the absence of CBD (10 µM) for 24 h. HaCaT cells used in the study have been validated by STR profiling and were routinely tested for mycoplasma. The generation of HaCaT-ARE-Luc cells has been described previously [25]. CRISPR-edited NRF2-KO HaCaT cells were produced by transfecting HaCaT cells with pLentiCRISPR-v2 (a gift from Dr Feng Zhang, Addgene plasmid #52961) containing a guide RNA directed against the exon 2 of the NFE2L2 locus (which encodes NRF2) (5'-TGGAGGCAAGATATAGATCT-3'). After 2 days of puromycin selection, cells were clonally selected by serial dilution, and positive clones were identified as previously described [26]. Control cells,

referred as HaCaT wild type (HaCaT WT), are the pooled population of surviving cells transfected with an empty pLentiCRISPRv2 vector treated with puromycin. All cell lines were grown in RPMI containing 10% FBS at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. Antibodies and reagents

Antibodies recognizing BACH1 (F-9), anti-Lamin B2 (C-20), anti-Tubulin (TU-02) and anti-cytokeratin 16 (sc-53255) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). anti-NRF2 (D1Z9C) was obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-HMOX1 (ab13243) and anti-cytokeratin 17 (ab109725) were obtained from Abcam (Cambridge, UK). HRP-conjugated secondary antibodies were obtained from Life Technologies (Carlsbad, California, USA). The siRNAs used as control or against BACH1, NRF2 and KEAP1 were the SMART pool: ON-Target Plus from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). MG132 was obtained from Santa Cruz Biotechnology, and Leptomycin B was obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). ⁹Δ-THC was purchased to Sigma Aldrich (San Louis, MI, USA) and other cannabinoids with a purity higher than 97% were obtained from Prof. Giovanni Appendino (University of Eastern Piedmont, Novara, Italy).

2.3. RNA-Seq

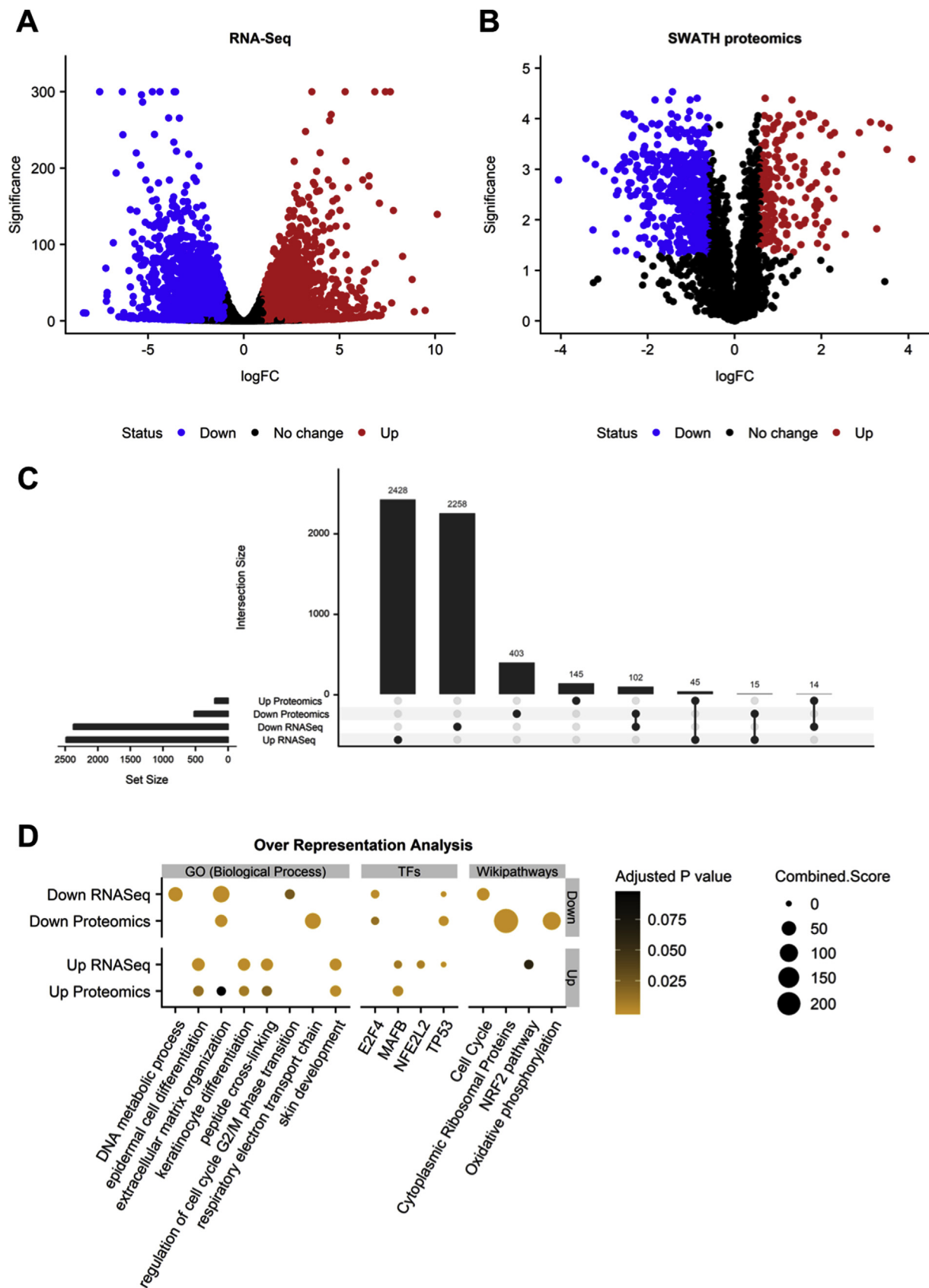
Total RNA was isolated from NHEK cells by Qiazol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and purified with miRNeasy mini kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. RNA was processed for high throughput sequencing using the Illumina TruSeq mRNA Sample Prep v2 kit (RS-122-2001). Transcriptome libraries were constructed by polyA purification. In brief, 1 µg of total RNA from each sample was used to construct a cDNA library, followed by sequencing on the Illumina HiSeq 2500 system with single end 50 bp reads and ~30 millions of reads per sample.

2.4. SWATH LC-MS/MS proteomics

Proteins were obtained by lysing NHEK cells in NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1% NP-40) supplemented with protease and phosphatase inhibitors and cleaned to remove contaminants by protein precipitation with TCA/acetone and solubilized in 50 µl of 0.2% RapiGest (Waters, Milford, MA, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate. Protein extracts were subjected to trypsin digestion. RePLiCal iRT (PolyQuant GmbH, Bad Abbach, Germany) peptides were added to the peptide samples in order to calibrate retention times in the SWATH runs. Samples (1 µg) were analysed by LC-MS/MS using a data-independent SWATH acquisition using a Triple TOF 5600 + mass spectrometer (Sciex) coupled to a nLC system with a 2 h gradient (5%–30% ACN 0.1% formic acid, 300 nL/min, column: Thermo PepMap100 25 cm x 75 µm id). For building the spectral library, shotgun data-dependent acquisition runs (top 65 method) were performed on the same LC-MS equipment and gradient.

2.5. Transcriptomic and proteomic data analysis

RNA-Seq reads were pre-processed with Trimmomatic (v0.36) [27] and aligned to human genome assembly hg38 using HISAT2 (v2.1.0) [28]. Then, counts per gene were obtained with featureCounts (v1.6.1) [29] and the differential expression analysis was carried out using DESeq2 (v1.20.0) [30] excluding those genes with less than 15 counts across all samples. For proteomics, proteins and peptides were identified from the DDA shotgun runs using ProteinPilot (v5.0) and a concatenated target-reverse decoy SwissProt human protein database. A spectral library was built using the MS/MS ALL with SWATH Acquisition MicroApp (v2.0) using the peptides that showed up in the database search with a confidence score above 99%. The library-assisted targeted



(caption on next page)

Fig. 1. Multi-omic analysis of the response of keratinocytes to CBD. The transcriptomic and proteomic profiling of RNA and protein samples was carried out using RNA-Seq and LC-MS/MS, respectively. (A, B) Volcano plots showing the magnitude (log2 fold change) and significance ($-\log_{10}$ p value) of the changes in the transcriptomic and proteomic comparisons of CBD treated keratinocytes versus controls ($n = 3$ for RNA-Seq and $n = 4$ for proteomics). Every point represents a gene/protein and the colour indicates those surpassing the cut-off of an adjusted P value < 0.05 and an absolute fold change > 2 (for genes) or > 1.5 (for proteins). For RNA-Seq, a small value ($1e-300$) was added to p values in order to avoid logarithms of zero at plotting. (C) Upset plot indicating the overlap between the sets of up or down regulated genes and proteins as a bar plot over a coincidence histogram. (D) Over-representation analysis results. The dot plot indicates with a point the significant over-representation of a given term, transcription factor or pathway in a group of up or down regulated genes/proteins (Fisher Exact Test adjusted $P < 0.1$). While the colour indicates the adjusted P value of the enrichment, the size of the point represents the enrichR combined score.

data extraction of the fragment ion chromatogram traces from the SWATH runs, and the retention time calibration, was performed by PeakView (v2.1) using the MS/MSALL with SWATH Acquisition MicroApp (v2.0), using a 1% FDR threshold and 50 ppm of tolerance. MarkerView (v1.2.1, Sciex) was used for signal normalization. Differential abundance analysis was performed by applying a Welch Two Sample T-Test to compare normalized SWATH areas between groups. For the functional analysis, genes with an adjusted $P < 0.05$ and an absolute fold change > 2 and proteins with an adjusted $P < 0.05$ and an absolute fold change > 1.5 were selected to perform an over-representation analysis. For this, the EnrichR tool was employed using Gene Ontology (Biological Process) terms, Wikipathways and transcription factors from JASPAR [31]. Finally, a gene set enrichment analysis was carried out for transcriptomic data with the fgsea (v1.9.7) package, using the same gene sets and pre-ranking the whole gene list by the log2 transformed fold change. All the P values from the different analyses were adjusted to control the false discovery rate (FDR) using the Benjamini and Hochberg approach [32]. RNA-seq data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) databank with the dataset identifier GSE131565. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [33] partner repository with the dataset identifier PXD013956.

2.6. Quantitative real time PCR (rt-qPCR)

RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen). 500 ng of RNA per sample was reverse-transcribed to cDNA using Omniscript RT kit (Qiagen) supplemented with RNase inhibitor according to the manufacturer's instructions. Resulting cDNA was analysed using TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was determined using an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system by the comparative $\Delta\Delta CT$ method. All experiments were performed at least in triplicates and data were normalized to the housekeeping gene HPRT1. The primers used are listed in [Supplementary Table S1](#).

2.7. siRNA cell transfections

On the day prior to transfection, cells were plated to the required cell density (70–90% confluency). The siRNA and Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were individually diluted in OptiMem (Life Technologies) and incubated for 10 min at room temperature. Diluted siRNA was added to the diluted Lipofectamine solution (1:1 ratio) and further incubated for 15 min. The complex was added to the cells and incubated in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 36 h prior treatment and lysis.

2.8. Cell lysis protocol and western blotting

Cells were washed and harvested in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in either SDS buffer or RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinin, 0.05 mM pefabloc]. Cells directly lysed in SDS were boiled for 2 min, sonicated and boiled again for another 5 min. Cells lysed in RIPA buffer were sonicated and lysates were cleared by centrifugation

for 15 min at 4 °C. Protein concentration was established using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Supernatant was mixed with SDS sample buffer and boiled for 5 min. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE, followed by semidry blotting to a polyvinylidene difluoride membrane (Thermo Fisher Scientific). After blocking of the membrane with 5% (w/v) TBST non-fat dry milk, primary antibodies were added. Appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were detected by enhanced chemiluminescence using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.9. Subcellular fractionation (nuclear/cytoplasmic separation)

Cells were washed and harvested with ice-cold PBS. Pelleted cells were resuspended in 400 µl of low-salt buffer A (10 mM Hepes/KOH pH7.9, 10 mM KCL, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM β-Mercaptoethanol). After incubation for 10 min on ice, 10 µl of 10% NP-40 was added and cells were lysed by gently vortexing. The homogenate was centrifuged for 10 s at 13,200 rpm in a microfuge. The supernatant representing the cytoplasmic fraction was collected and the pellet containing the cell nuclei was washed 4 additional times in buffer A, then resuspended in 100 µl high-salt buffer B (20 mM Hepes/KOH pH7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM β-mercaptoethanol). The lysates were sonicated and centrifuged at 4 °C for 15 min at 13,200 rpm. The supernatant representing the nuclear fraction was collected. Protease and phosphatase inhibitors were freshly added to both buffers.

2.10. Determination of heme

Heme levels were detected using the Hemin Assay Kit (MAK036, Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^6 cells were homogenized in 4 vol of cold hemin assay buffer. Samples were centrifuged at $13000 \times g$ for 10 min at 4 °C to remove the cellular debris and diluted with hemin assay buffer. After adding the proper reaction mix and incubate for 10 min, absorbance was measure at 570 nm in a kinetic mode. Data were shown as amount of heme (fmole) using a hemin standard curve.

2.11. Luciferase assays

HaCaT-ARE-Luc cells were stimulated with either Sulforaphane (SFN) (5 µM) or with increasing concentrations of cannabinoids for 6 h. After the treatment the cells were washed twice in PBS and lysed in 25 mM Tris-phosphate pH 7.8, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, and 7% glycerol during 15 min at room temperature in a horizontal shaker. After centrifugation, luciferase activity in the supernatant was measured using a GloMax 96 microplate luminometer (Promega) following the instructions of the luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA). Results are expressed in RLU over control untreated cells.

2.12. ROS determination

The intracellular accumulation of ROS was detected using 2',7'-dihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA). HaCaT cells (15×10^3 cells/

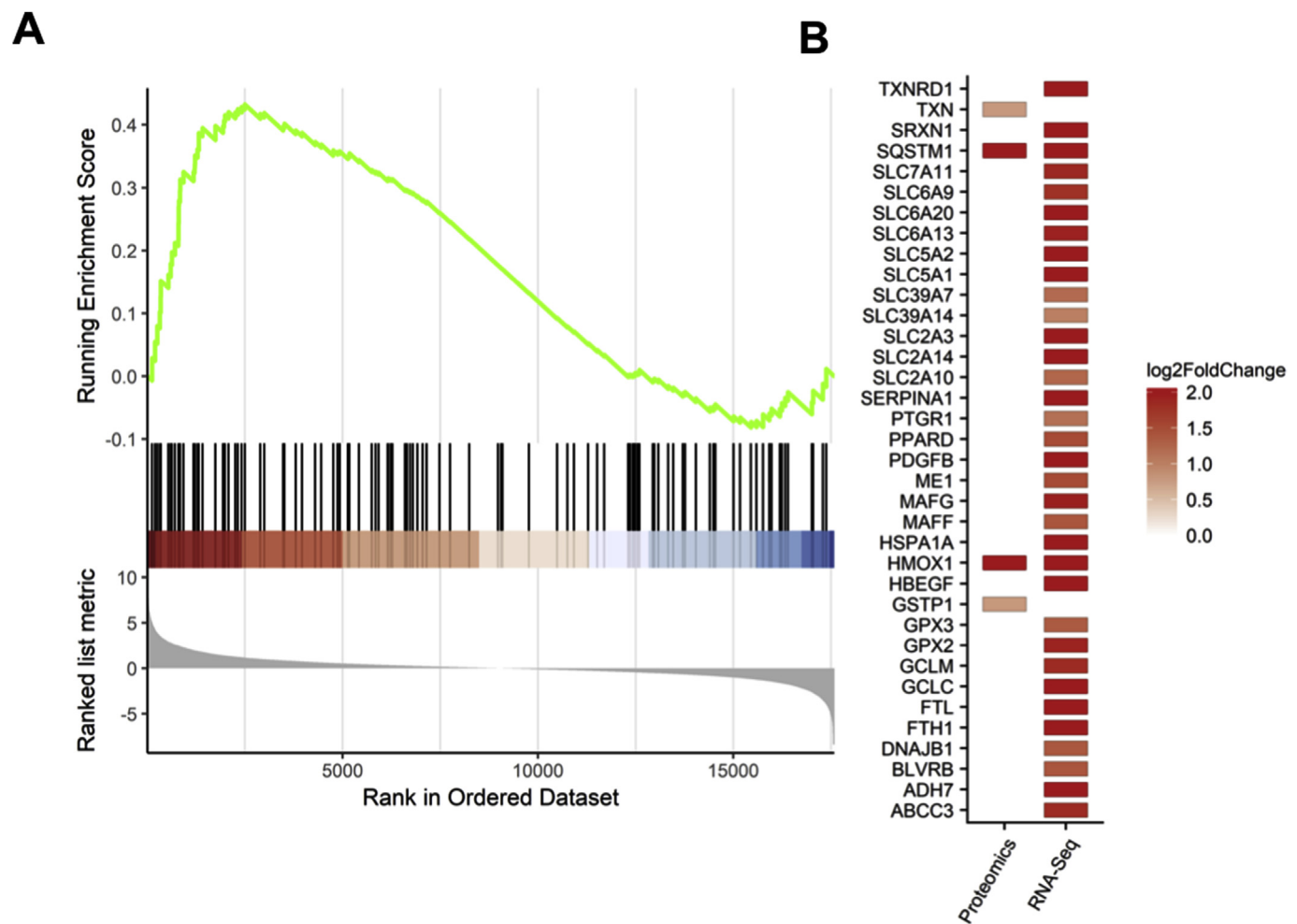


Fig. 2. Validation of the NRF2 pathway as a target of CBD in keratinocytes. (A) Gene set enrichment analysis plot for the NRF2 signalling pathway transcriptomic changes. Black lines indicate the position of NRF2 genes in the pre-ranked gene list and the green line indicates the running enrichment score. (B) Magnitude of the changes for significantly up-regulated genes and proteins selected using the previously mentioned cut-offs in the CBD versus control comparison. (C) Primary human keratinocytes were incubated with either DMSO or CBD (10 μ M) for 24 h. The mRNA levels for *HMOX1* (upper panel) and *SQSTM1* (p62) (lower panel) were quantified using real-time PCR. The data were normalized using *HPRT1* as an internal control. Data represent means \pm SD (n = 3) and are expressed relative to the DMSO sample. ***P \leq 0.001. (D) HaCaT cells were incubated with either DMSO or increasing concentration of CBD for 16 h. The mRNA levels for *HMOX1* (upper panel) and *SQSTM1* (p62) (lower panel) were quantified using real-time PCR as previously indicated (n = 3) *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001. (E) HaCaT-ARE-Luc cells were treated with either SFN or CBD at the indicated concentrations for 6 h. Luciferase activity was measured in the cell lysates and expressed as RLU (x 10⁴). Data represent means \pm SD (n = 4) and are expressed relative to untreated cells. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.

well) were cultured in a 96-well plate in DMEM supplemented with 10% FBS until cells reached 80% confluence. For induction of ROS the cells were treated with increasing concentrations CBD. For inhibition, the cells were pre-treated with CBD for 30 min and treated with 0.4 mM Tert-butyl-hydroperoxide (TBHP). Three hours later the cells were incubated with 10 μ M DCFH-DA in the culture medium at 37°C for 30 min. Then, the cells were washed with PBS at 37°C and the production of intracellular ROS measured by DCF fluorescence was detected using the Incucyte FLR software, the data were analysed by the total green object integrated intensity (GCUx μ m²xWell) of the imaging system IncuCyte HD (Sartorius, Göttingen, Germany). N-Acetyl cysteine (NAC) (15 mM) was used as a positive control that inhibited TPHP-induced ROS production.

2.13. Animal studies

Six-months old female BALB/cByJRj mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were housed in groups (control n = 3, CBD 0.1% n = 6, and CBD 1% n = 6) at 20–22°C under constant conditions of light (14 h of light; lights on at 7:00 a.m.) and 40–50% relative humidity with free access to standard food and water. The back of the mice was shaved, and the animals were treated topically with vehicle (10% DMSO in propylene glycol), CBD 0.1%, 1% or 10% once a day for 5 days. At the end of the experiment, mice were euthanized, and mouse skin was collected, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for subsequent histological analysis. All experiments were performed in accordance with European Union guideline and approved by the Animal Research Ethic Committee of The University of Córdoba (2014PI/025).

2.14. Histology and immunohistochemistry

Five- μ m sections from mouse skin were deparaffinised with xylene and rehydrated with decreasing concentration of ethanol and water. Then, sections were stained with haematoxylin for 5 min, washed in running water and differentiated in acid ethanol for a few seconds. Once rinsed, sections were stained with eosin for 30 s and dehydrated with increasing concentration of ethanol. Finally, after a 2-min xylene bath, samples were mounted and analysed under the microscope. For IHC, antigen retrieval was performed by microwave heating for 5 min in citrate buffer (10 mM, Ph 6.0) for cytokeratins and HMOX1 antibodies. Neutralization of endogenous peroxidase was performed using EnVision FLEX-peroxidase blocking reagent (Agilent Dako, Glostrup, Denmark) for 10 min. Samples were blocked with 3% bovine serum albumin for 30 min, and the mouse-on-mouse staining protocol (Rodent Block M, RBM961L, Biocare Medical, Pacheco, CA, EEUU) was used for cytokeratin 16 mouse antibody. Then, tissue sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Samples were incubated with EnVision FLEX + mouse/rabbit linker and EnVision FLEX/HRP (Agilent Dako), for 30 min at RT each. Finally, detection was performed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen and sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated, mounted and analysed with a Leica DM2000 microscope. Pictures were taken with a Leica MC190 camera. The quantification of IHCs was performed measuring the stained area in the epidermis from more than 8 fields per condition with ImageJ software (Bethesda, MD, USA).

2.15. Statistical analyses

Most experiments were repeated 3–5 times with multiple technical replicates to be eligible for the indicated statistical analyses. Data were analysed using Graphpad Prism statistical package. All results are presented as mean \pm SD unless otherwise mentioned. For animal studies, five-eight mice per group was the standard sample size as defined by statistical power analyses (80% power; p < 0.05) carried out using R packages. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment. When applicable, the differences between groups were determined by either one-way ANOVA or 2-way ANOVA. A P value of < 0.05 was considered significant. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.

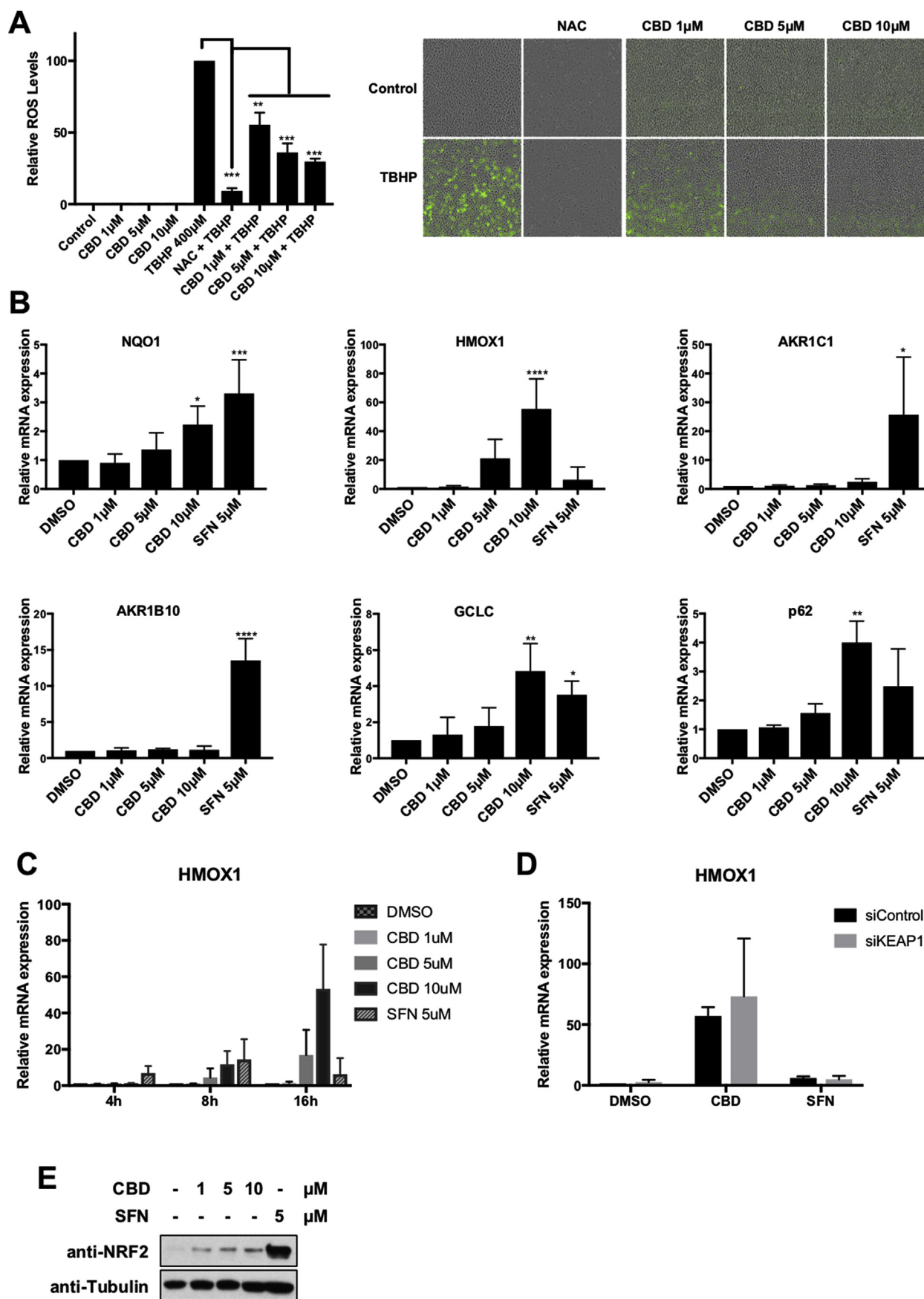
3. Results

3.1. Proteomics and transcriptomic analysis in primary keratinocytes treated with CBD

To obtain a first insight into the changes produced by CBD in epidermal cells, primary human keratinocytes were incubated with either solvent or CBD (10 μ M) for 24 h and transcriptomic and proteomic changes were analysed through RNA-Seq and SWATH LC-MS/MS, respectively. From 17571 genes quantified the treatment with CBD altered the expression (adjusted P < 0.05 and absolute fold change > 2) of 4860 genes, of which 2374 were downregulated and 2486 up-regulated (Fig. 1A). At the proteome level, 724 out of 2204 quantified proteins surpassed the cut-off (adjusted P < 0.05 and absolute fold change > 1.5). From them, 520 decreased and 204 increased their abundance (Fig. 1B). Additionally, 147 features were found to be significantly altered in the same direction at both levels when comparing the overlap between the mRNA and protein sets (Fig. 1C). Finally, to explore the functional impact of the observed changes, we performed an over-representation analysis of the different sets of up and down regulated genes and proteins using enrichR. We found several pathways enriched (adjusted P < 0.1) in the group of up-regulated features related with the skin biology as “epidermal cell differentiation”, “keratinocyte differentiation”, “skin development” and also transcription factors such as the NRF2 (“NFE2L2” and “NRF2 pathway”). On the other hand, we found terms and pathways that were enriched in the group of down-regulated genes and proteins as “extracellular matrix organization”, “DNA metabolic process” and “Cell Cycle” (Fig. 1D). This functional portrait of the transcriptomic and proteomic changes suggested that CBD may promote keratinocyte proliferation and differentiation, and upregulated genes and proteins implicated in skin development. However, the result that strongly caught our attention was the activation of the transcriptional activity of NRF2, given the importance of this antioxidant transcription factor in keratinocyte biology [34].

3.2. Validation of the NRF2 pathway as a target of CBD in keratinocytes

In order to validate the data obtained from the RNA-Seq and mass spectrometry analysis, we selected candidates that were highly induced by CBD at both protein and mRNA levels (i.e. SQSTM1, also known as p62, and HMOX1) (Fig. 2A–B), and we tested by qRT-PCR the effect of



(caption on next page)

Fig. 3. CBD activates a subset of NRF2 target genes. **A)** ROS detection in HaCaT labelled with DCFH-DA, HaCaT cells was treated as indicated and the detection and quantification of ROS (DCF fluorescence) measured by fluorescence microscopy (left panel). Data represent means \pm SD ($n = 5$) and are expressed relative to control cells. $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$. Representative pictures are shown in the right panel. **B)** HaCaT cells were incubated with either DMSO, SFN (5 μ M), or increasing concentration of CBD for 16 h. The mRNA levels for the indicated genes were quantified using real-time PCR. The data were normalized using *HPRT1* as an internal control. Data represent means \pm SD ($n = 3$) and are expressed relative to the DMSO sample. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$. **C)** HaCaT cells were incubated with either DMSO, SFN (5 μ M), or increasing concentration of CBD for 4, 8 and 16 h. The mRNA levels for *HMOX1* were quantified using real-time PCR as previously indicated ($n = 3$). **D)** HaCaT cells were transfected with either siControl or siKEAP1. 36 h later cells were incubated with either DMSO, SFN (5 μ M), or CBD (10 μ M) for another 16 h. The mRNA levels for *HMOX1* were quantified as previously indicated ($n = 3$). **E)** HaCaT cells were incubated with either DMSO (–), CBD or SFN as indicated. Three hours later, cells were lysed, and levels of NRF2 and Tubulin were analysed by Western blot.

CBD on their expression in primary human keratinocytes (Fig. 2C) and in the immortalised human keratinocyte cell line HaCaT (Fig. 2D). Our results showed that in fact, CBD treatment induced the expression of the selected NRF2 target genes in both primary and immortalised human keratinocytes. Furthermore, using a HaCaT NRF2 reporter (ARE-luc) cell line we tested if CBD was also able to activate a synthetic reporter gene containing the ARE sequence from the NQO1 promoter fused to luciferase. Our results show that when compared with the potent NRF2 activator sulforaphane (SFN), CBD is a weak inducer of ARE-Luc (Fig. 2E).

3.3. CBD activates a subset of NRF2 target genes

Compounds or drugs that activate the NRF2 pathway could act either directly by stabilising NRF2, or indirectly by inducing ROS which will consequently activate NRF2. Examples of the former are the natural compound sulforaphane [35] and the synthetic compound TBE31 [36]. As CBD, albeit weak, appeared to be an activator of NRF2, we wondered whether it was a direct activator, or if, as it has been suggested in the literature, CBD activates NRF2 indirectly by inducing ROS [37,38]. Our results showed that CBD, at the concentrations previously used, not only did not induce ROS, but it was able to reduce ROS levels induced by tBHP (tert-Butyl hydroperoxide) in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). Secondly, as CBD was only weakly inducing the expression of an ARE-luc construct, we further tested whether CBD was a good NRF2 activator. To do so, we compared the effect of CBD and SFN on the expression of a panel of NRF2 target genes (Fig. 3B). Interestingly, CBD was equally or more potent than SFN at inducing the expression of a subset of NRF2 target genes (e.g. *HMOX1*, *GCLC* and *p62*), but dramatically less potent inducing the expression of other NRF2 target genes (i.e. the aldo-ketoreductases *AKR1B10* and *AKR1C1*). *HMOX1* was the gene in which the effect of CBD was clearer and in which CBD was significantly more potent than SFN. To further characterise the differences between CBD and SFN we studied the kinetics of *HMOX1* induction in response to either CBD or SFN (Fig. 3C). Our data showed that in response to SFN, *HMOX1* induction peaked at 8 h after treatment (14-fold mean induction), returning to basal levels at 16 h. In contrast, CBD treatment maintained a high *HMOX1* expression at 16 h (53-fold mean induction) suggesting that CBD has a stronger or a more persistent effect on *HMOX1* than that of SFN. Notably, other cannabinoids such as Δ^9 -THC, CBC or CBG were less potent in inducing *HMOX1*, and their acidic forms were completely inactive (Fig. S1A).

SFN, as most electrophilic compounds, acts via KEAP1, but as CBD is not electrophilic, we hypothesized that CBD might act in a KEAP1-independent manner. To test this hypothesis, we tested the effect of CBD on *HMOX1* expression in control cells or in cells where KEAP1 had been depleted. Our results showed that CBD was still able to induce the expression of *HMOX1* in KEAP1 knocked-down cells (Fig. 3D), demonstrating that the effect of CBD is independent of KEAP1. Interestingly, although KEAP1 knockdown greatly induced the expression of *AKR1C1* (Fig. S1B), *HMOX1* basal levels were not significantly changed by KEAP1 knockdown, revealing that in this setting, activation of NRF2 by itself is not enough to induce *HMOX1* expression.

To further compare CBD and SFN, we directly assessed their effect on NRF2 protein levels. While SFN treatment strongly stabilised NRF2 protein levels, the effect of CBD was very mild in comparison (Fig. 3E).

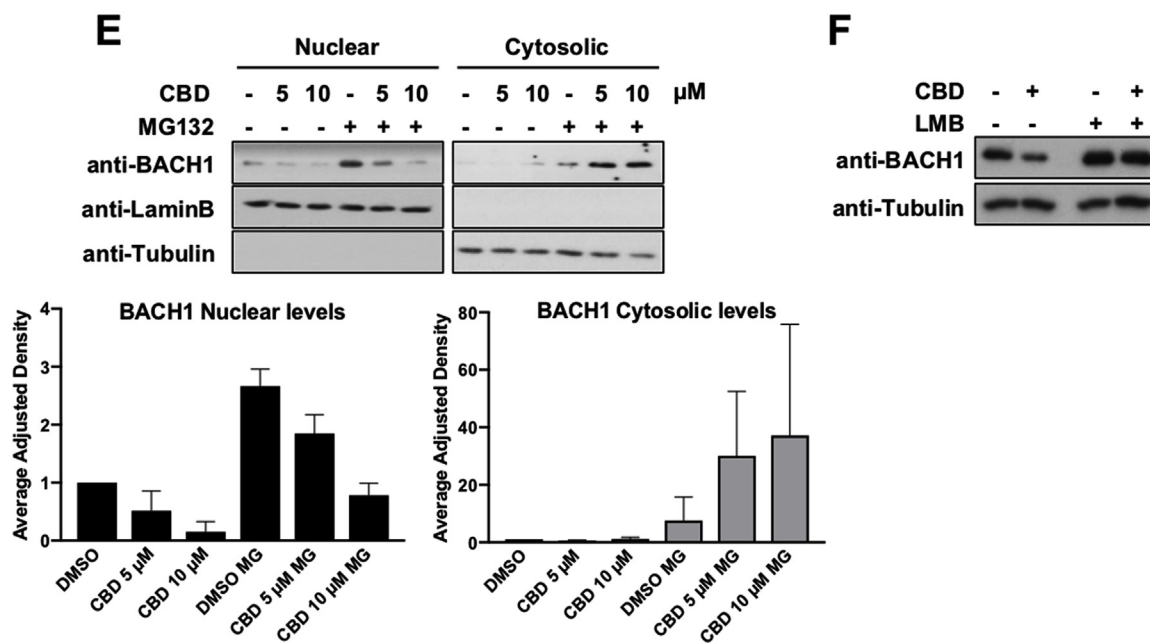
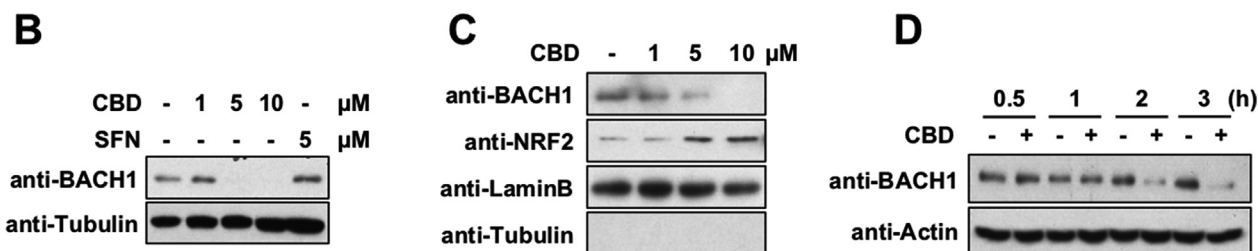
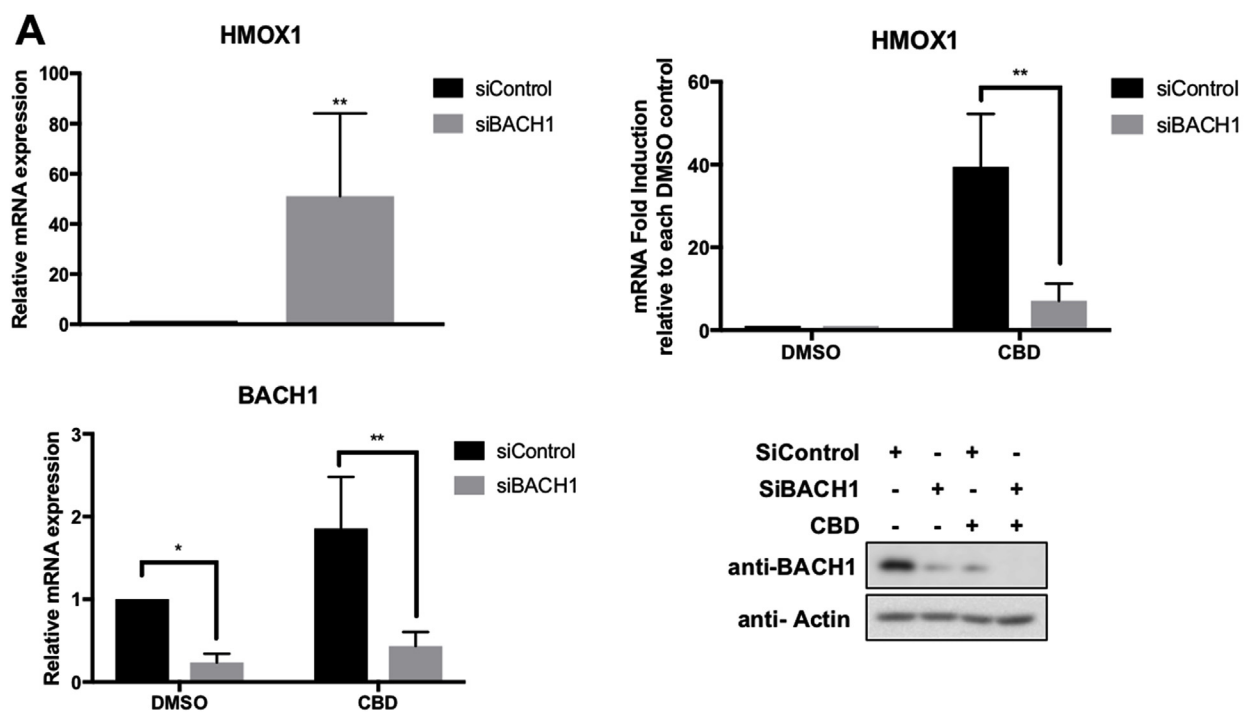
All together, these results suggest that a) the mechanism of action of both compounds is different; and b) the strong effect of CBD on *HMOX1* expression does not correlate with its weak effect on NRF2 stability, and therefore NRF2 activation is not likely the main mechanism responsible for CBD-mediated *HMOX1* activation.

3.4. CBD activates *HMOX1* in a BACH1-dependent manner

Based on our results, CBD only weakly stabilises NRF2, and its positive effect on NRF2 target genes is restricted to a subset of genes. Previous studies in keratinocytes have shown that while KEAP1 knockdown led to a weak induction of *HMOX1* (2–5-fold induction), BACH1 knockdown strongly induced *HMOX1* (135-fold induction) without affecting other NRF2 target genes (i.e. aldo-ketoreductases) [14]. Therefore, BACH1 appeared as a potential molecular target for CBD that could explain the observed selective transcriptional effect. To test this hypothesis, we compared the induction of *HMOX1* in response to CBD in HaCaT cells transfected with either siControl or siBACH1. In agreement with previous reports, BACH1 knockdown by itself strongly induced *HMOX1* levels (mean 51-fold) (Fig. 4A, upper left panel). Importantly, CBD induced the expression of *HMOX1* in control cells (mean 58-fold) but its effect was greatly reduced in BACH1 knocked-down cells (mean 10-fold) (Fig. 4A, upper right panel), showing the relevance of BACH1 for the effect of CBD on *HMOX1*. Moreover, BACH1 depletion also abolished the induction of *HMOX1* mediated by the BACH1 inhibitor hemin, but not the one mediated by SFN (Fig. S2A), further demonstrating the different mechanism of action used by CBD and hemin in comparison with SFN.

Most described regulatory mechanisms for BACH1 are at post-translational level, affecting either its localisation and/or stability. For instance, the main negative regulator of BACH1, heme, inactivates BACH1 leading to its nuclear exclusion and cytosolic degradation [13,39,40]. To test if CBD had an effect on the levels of BACH1, we exposed HaCaT cells to increasing concentrations of CBD and measured BACH1 protein levels. Our data showed that CBD dramatically reduced both, BACH1 total (Fig. 4B) and BACH1 nuclear levels (Fig. 4C) in a dose dependent manner, and that this effect is obvious as soon as 2 h after CBD treatment (Fig. 4D). Compared with SFN, CBD is a weak inducer of NRF2, but a potent BACH1 inhibitor (Fig. 3E and Fig. 4B). To test whether CBD was inducing BACH1 proteasomal degradation in either the nucleus or the cytoplasm, we pre-treated the cells with or without the proteasome inhibitor MG132 and analysed the effect of CBD on BACH1 nuclear and cytosolic levels (Fig. 4E). Interestingly, CBD treatment led to reduction of nuclear BACH1, which was not recovered by MG132, suggesting that BACH1 is not degraded in the nucleus. On the other hand, CBD treatment in presence of MG132 led to accumulation of cytosolic BACH1. Based on these results we hypothesized that CBD treatment might induce BACH1 nuclear export and its cytosolic degradation. To further test that hypothesis, we treated cells with or without the nuclear export inhibitor leptomycin B in combination with CBD (Fig. 4F). Our results showed that leptomycin B completely abolished the effect of CBD on BACH1 levels. Altogether, our data demonstrate that CBD leads to BACH1 degradation via a mechanism that involves BACH1 nuclear export and cytosolic degradation.

The mechanism by which CBD regulates BACH1 resembles the one shown for the BACH1 inhibitor hemin [13,39,40]. These similarities



(caption on next page)

Fig. 4. CBD activates HMOX1 in a BACH1-dependent manner. A) HaCaT cells were transfected with either siControl or siBACH1. 36 h later, cells were incubated with either DMSO or CBD (10 μ M) for another 16 h. To measure the effect of BACH1 depletion on *HMOX1* expression, the mRNA levels for *HMOX1* in siControl and siBACH1 DMSO treated cells were quantified using real-time PCR as previously described (upper left panel). To compare the *HMOX1* induction upon CBD treatment in each cell line, the levels of *HMOX1* in either siControl CBD or siBACH1 CBD samples were compared against the levels of *HMOX1* in siControl DMSO or siBACH1 DMSO samples respectively (*HMOX1* levels in DMSO samples were set in both cases as 1) (upper right panel). The CBD-mediated *HMOX1* induction in both cell lines was quantified by real-time PCR using *HPRT1* as an internal control. Data represent means \pm SD ($n = 3$). To control for the efficiency of the knockdown, the mRNA levels (lower left panel) and protein levels (lower right panel) of BACH1 were analysed by real-time PCR and western blot respectively. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. B) HaCaT cells were incubated with either DMSO (–), CBD or SFN as indicated. Three hours later, cells were lysed, and levels of BACH1 and Tubulin were analysed by Western blot. (These blots and the blots from Fig. 3E are from the same experiment, and thus share the same tubulin. For clarity's sake we decided to show them in two different subfigures). C) HaCaT cells were incubated with either DMSO (–) or increasing concentrations of CBD. Three hours later, cells were collected, nuclear and cytosolic fractions were isolated and the nuclear fraction was analysed for the levels of BACH1 and NRF2. D) HaCaT cells were incubated with either DMSO or CBD (10 μ M) for different periods of time as indicated. Cells were lysed and protein levels of BACH1 were analysed. E) HaCaT cells were incubated with either DMSO (–) or MG132 (10 μ M). Two hours later, CBD was added. Three hours later, cells were collected, nuclear and cytosolic fractions were isolated and analysed for the levels of BACH1. Upper panel is a representative western blot; lower panel shows the quantification of BACH1 protein levels in the nuclear and cytosolic fraction normalized against their respective loading controls. Data represent means \pm SD ($n = 3$) and are expressed relative to the DMSO samples. F) HaCaT cells were incubated with either DMSO (–) or Leptomycin B (LMB) (5 nM). Two hours later, CBD (10 μ M) was added for another 3 h. After that, cells were lysed and protein levels of BACH1 were analysed.

prompted us to study if CBD could be inhibiting BACH1 by modulating the levels of intracellular heme. Our results showed that CBD did not increase the levels of heme (Fig. S2B), neither was the effect of CBD on either BACH1 protein levels or *HMOX1* mRNA levels impaired by inhibitors of the heme biosynthesis (Figs. S2C and S2D), suggesting that the effect of CBD is independent of heme.

3.5. CBD induces *HMOX1* in a NRF2-independent manner

In the current model, BACH1 depletion is the first step before NRF2 could induce *HMOX1*. Therefore, we hypothesized that as the effect of CBD on *HMOX1* involved BACH1 inhibition, it would be impaired by NRF2 depletion. Surprisingly, NRF2 knockdown did not affect CBD-mediated *HMOX1* induction (Fig. 5A) although, it impaired the SFN-mediated *AKR1C1* induction (Fig. S3A). To confirm our results using a complementary approach, we produced CRISPR-mediated NRF2-KO HaCaT cells. We verified that these cells had no detectable NRF2 protein levels (Fig. S3B), and significantly lower mRNA levels of *NQO1* and *AKR1B10*, two of the best markers for NRF2 activity (Fig. S3C). Using these cells, we found that in agreement with our siRNA approach, both CBD and hemin were still able to strongly induce *HMOX1* in the absence of NRF2 (Fig. 5B), while the effect of SFN was completely abolished (Fig. S3D), suggesting that NRF2 is not necessary for *HMOX1* induction mediated by BACH1. However, as both compounds, CBD and hemin, are likely to target other proteins in addition to BACH1, their effect on *HMOX1* might not be solely dependent on BACH1. To test this possibility, we directly assessed the effect of knocking down BACH1 on *HMOX1* levels in NRF2-KO cells, with or without CBD or hemin treatment. BACH1 knockdown by itself led to a strong induction of *HMOX1* in NRF2-KO HaCaT cells (mean 50-fold) (Fig. 5C, upper left panel), similar to the induction observed in WT HaCaT cells (Fig. 4A), showing that NRF2 is not necessary for the *HMOX1* induction upon BACH1 depletion. Additionally, both CBD and hemin strongly induced *HMOX1* in NRF2-KO HaCaT cells, and BACH1 depletion almost completely impaired the induction of *HMOX1* mediated by both compounds (Fig. 5C, upper right panel). These results demonstrate that: a) the effect of CBD and hemin on *HMOX1* expression is BACH1-dependent and NRF2-independent; and b) in HaCaT cells, NRF2 is not necessary for BACH1-mediated *HMOX1* induction.

3.6. Effect of topical CBD in skin in vivo

Next, we treated mice with concentrations of topically-applied CBD that mimic the range of concentrations found in commercially available CBD-based products (0.1–1%) and studied the effect of CBD on epidermal morphology. As we are interested in the effect of CBD on the skin of adults (which is the age group for which CBD-based creams is marketed), we used 6 months old mice, a model that resembles adult

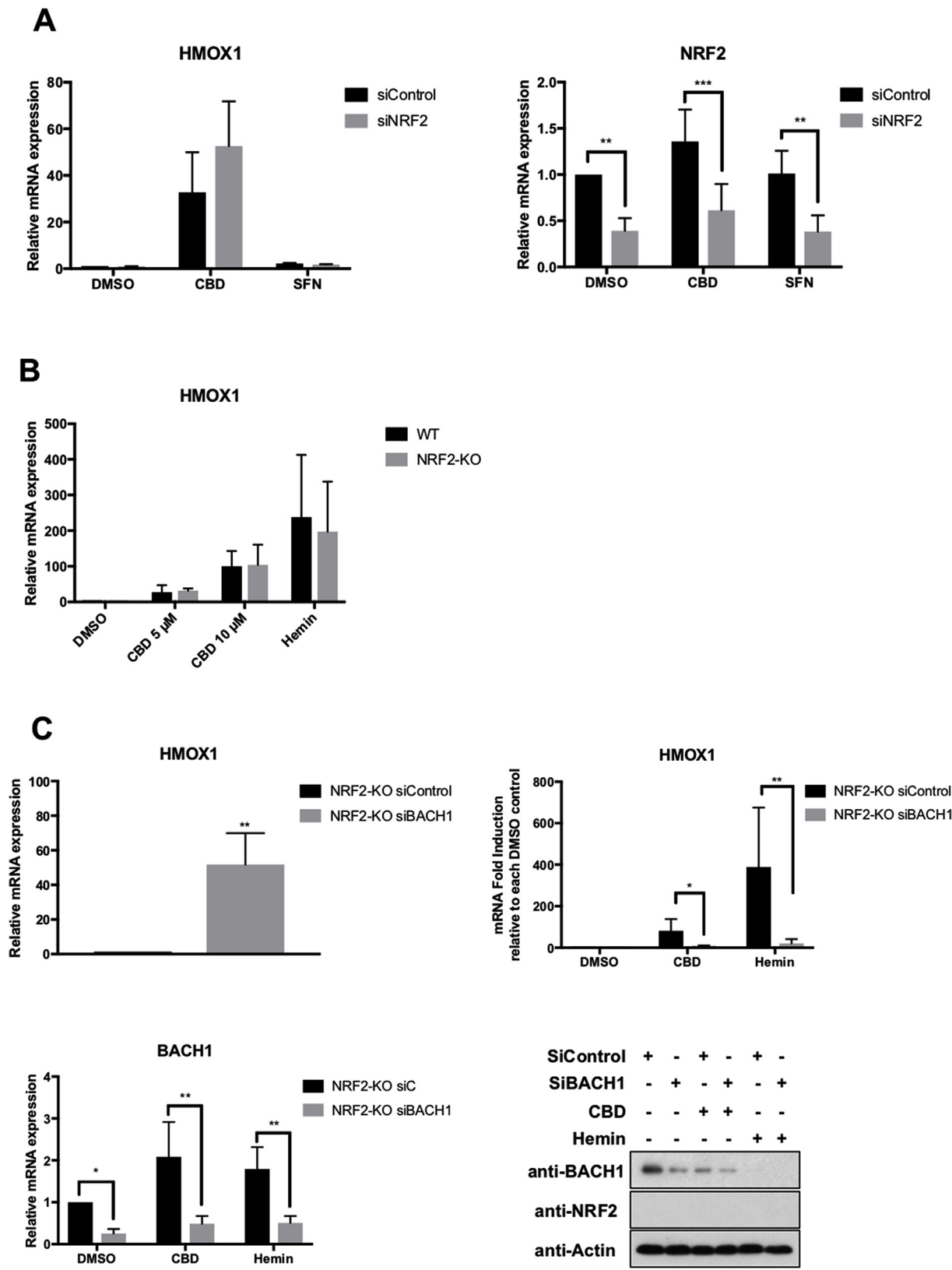
skin. We observed that treatment with CBD induced keratinocyte proliferation (measured by epidermal thickness) (Fig. 6A) and increased the levels of *HMOX1* (Fig. 6B). Moreover, CBD also increased the levels of cytokeratins 16 and 17 (Fig. 7A), which are associated with keratinocyte hyperproliferation [41] and wound repair [42]. Although both *HMOX1* and KRT16 and KRT17 are also considered markers of stress and inflammation, CBD did not induce the expression of typical pro-inflammatory cytokines (i.e IL1 β , IL6 and TNF α) (Fig. S4) suggesting that the effect of CBD on *HMOX1* is not due to an inflammatory response.

4. Discussion

The potential use of CBD for treatment of skin disorders and cosmetic indications is gaining momentum, although the mechanism of action of CBD on different skin cell types is not understood [43,44]. Using a system biology approach combining transcriptomic and proteomic data we have identified for the first time the major pathways that are regulated by CBD on human primary keratinocytes cultivated under non-differentiating conditions, which could explain some of the potential beneficial effects of CBD in the skin. Importantly, although a potential link between CBD and the NRF2 pathway has been suggested in other cells types, no molecular mechanism has been identified so far. In that sense, our work reveals for the first time the link connecting CBD with the NRF2 pathway. However, although our study does not identify the specific molecular mechanism by which CBD induces BACH1 cytosolic degradation, our results suggest that it is independent on the levels of heme, and thus a different mechanism than the one used by the BACH1 inhibitor Hemin. A recent report showed that Fbxo22 is the E3 ligase responsible for the degradation of BACH1 [45]. Due to the rapid effect of CBD on BACH1 levels, we hypothesise that CBD might be directly affecting the same or a different E3 ligase controlling BACH1 turnover.

It is interesting that although one of the signatures identified in our system biology analysis was the NRF2 pathway, which suggested that CBD could be an NRF2 activator, our biochemical analysis demonstrated that CBD is a weak NRF2 activator but a potent BACH1 inhibitor, and thus BACH1 is the main target of CBD in keratinocytes. As the transcriptional signature of BACH1 overlaps with that of NRF2, it is not unexpected that a BACH1 inhibitor presents a signature partially similar to an NRF2 activator. Nevertheless, our analysis shows that CBD is also a weak inducer of NRF2, which could be an indirect effect of its negative effect on BACH1. A potential explanation could be that as BACH1 repress p62 expression, and CBD inhibits BACH1 increasing p62 levels, CBD might stabilise NRF2 indirectly by inducing the expression of the KEAP1 competitor p62 [46].

The best characterised BACH1 target is *HMOX1*, which is the mRNA and the protein that was most regulated by CBD in our analyses.



(caption on next page)

Unexpectedly, we identified that the *HMOX1* induction mediated by CBD was NRF2 independent. In the current general model of *HMOX1* activation, BACH1 and NRF2 work together controlling its expression. However, pioneer work in mice showed that although that is true for some tissues (i.e. lung, heart and liver), in thymus the induction of

HMOX1 in response to BACH1 depletion was independent of NRF2 [47]. Our results demonstrate that in HaCaT cells, NRF2 is not necessary for the induction of *HMOX1* upon BACH1 depletion/inhibition, supporting a novel regulatory mechanism involving BACH1 and an unidentified positive regulator. This agrees with the original

Fig. 5. CBD activates HMOX1 in a NRF2-independent manner. **A)** HaCaT cells were transfected with either siControl or siNRF2. 36 h later cells were incubated with either DMSO, CBD (10 μ M) or SFN (5 μ M) for another 16 h. The mRNA levels for *HMOX1* (left panel) and *NRF2* (right panel) were quantified using real-time PCR. The data were normalized using *HPRT1* as an internal control. Data represent means \pm SD (n = 3) and are expressed relative to the siControl DMSO sample. $^{**}P \leq 0.01$, $^{***}P \leq 0.001$. **B)** Control (WT) and NRF2-KO HaCaT cells were incubated with either DMSO, CBD or Hemin (10 μ M). 16 h later, the mRNA levels for *HMOX1* were quantified using real-time PCR as previously described (n = 3). **C)** Control (WT) and NRF2-KO HaCaT cells were transfected with either siControl or siBACH1. 36 h later cells were incubated with DMSO, CBD (10 μ M) or hemin (10 μ M) for another 16 h. To measure the effect of BACH1 depletion on *HMOX1* expression, the mRNA levels for *HMOX1* in siControl and siBACH1 DMSO-treated cells were quantified using real-time PCR as previously described (upper left panel). To compare the *HMOX1* induction upon treatment with CBD or hemin in each cell line, the levels of *HMOX1* in either siControl CBD/hemin or siBACH1 CBD/hemin were compared against the levels of *HMOX1* in either siControl DMSO or siBACH1 DMSO respectively (*HMOX1* levels in DMSO samples were set in both cases as 1) (upper right panel). The *HMOX1* induction in response to either CBD or hemin was quantified by real-time PCR using *HPRT1* as an internal control. Data represent means \pm SD (n = 3). To control for the efficiency of the knockdown, the mRNA levels (lower left panel) and protein levels (lower right panel) of BACH1 were analysed by real-time PCR and western blot respectively. $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$.

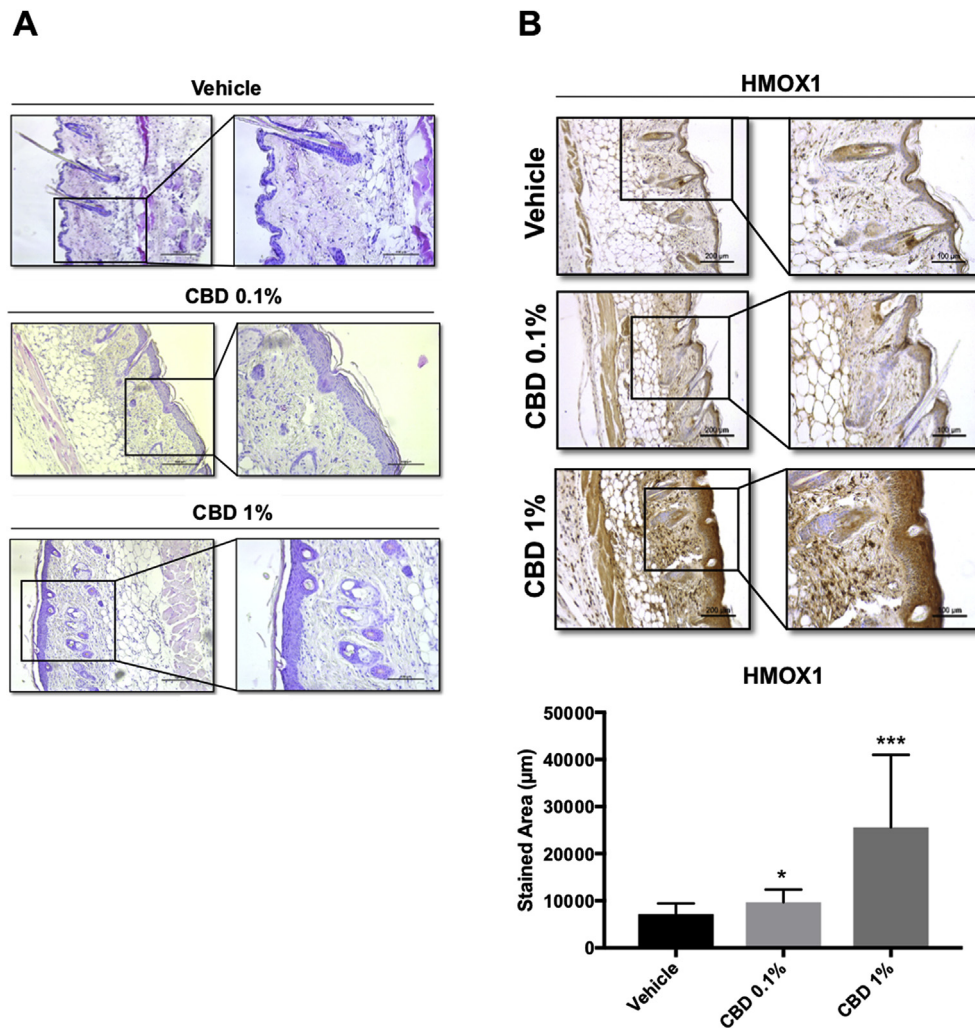


Fig. 6. CBD treatment increases the keratinocyte layer in the epidermis and the expression of HMOX1. **(A)** Haematoxylin-eosin staining of 5 μ m paraffin-embedded sections were analysed by bright field microscopy. **(B)** Representative images of HMOX1 immunohistochemistry from mouse skin after 5 days of treatment with vehicle, CBD 0.1% or 1% **(C)** Quantification of HO-1 stained area in mouse epidermis. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ compared with control. Scale bars: 200 (left) and 100 μ m (right). n = 15 for vehicle treated samples and n = 12 for CBD treated samples.

publication, showing that the role of NRF2 controlling HMOX1 expression might be redundant with other activators in a tissue/cell line specific manner. Although NRF2 is the main positive regulator, *HMOX1* expression can also be regulated by other members of the CNC (NRF1 and NRF3) and MAF family (large and small MAFs), HSF1, c-jun, AP1 and NF- κ B [48], and thus either of these factors could be responsible for the induction of *HMOX1* in response to BACH1 depletion/inhibition. As CBD induces the expression of a MAFB expression signature (Fig. 1D) and also of small MAFF and MAFG (Fig. 2B), these members of the MAF family could potentially be involved in the positive regulation of *HMOX1* in the absence of BACH1. Further work is necessary to address

which factors can compensate for the lack of NRF2 in the different tissues, and in HaCaT and primary keratinocytes in particular.

In skin, HMOX1 is an important cytoprotective enzyme with antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. Due to such protective roles, treatments that regulate *HMOX1* expression would be useful for the treatment of inflammatory- or oxidative stress-associated skin conditions. In these scenarios, BACH1 inhibitors might be very useful, due to their potent activity as *HMOX1* inducers. Our validation of CBD as an BACH1 inhibitor suggests that CBD treatment would a) protect the skin against external insults: e.g. against UVA-irradiation-induced damage; and b) be greatly beneficial in a variety of skin

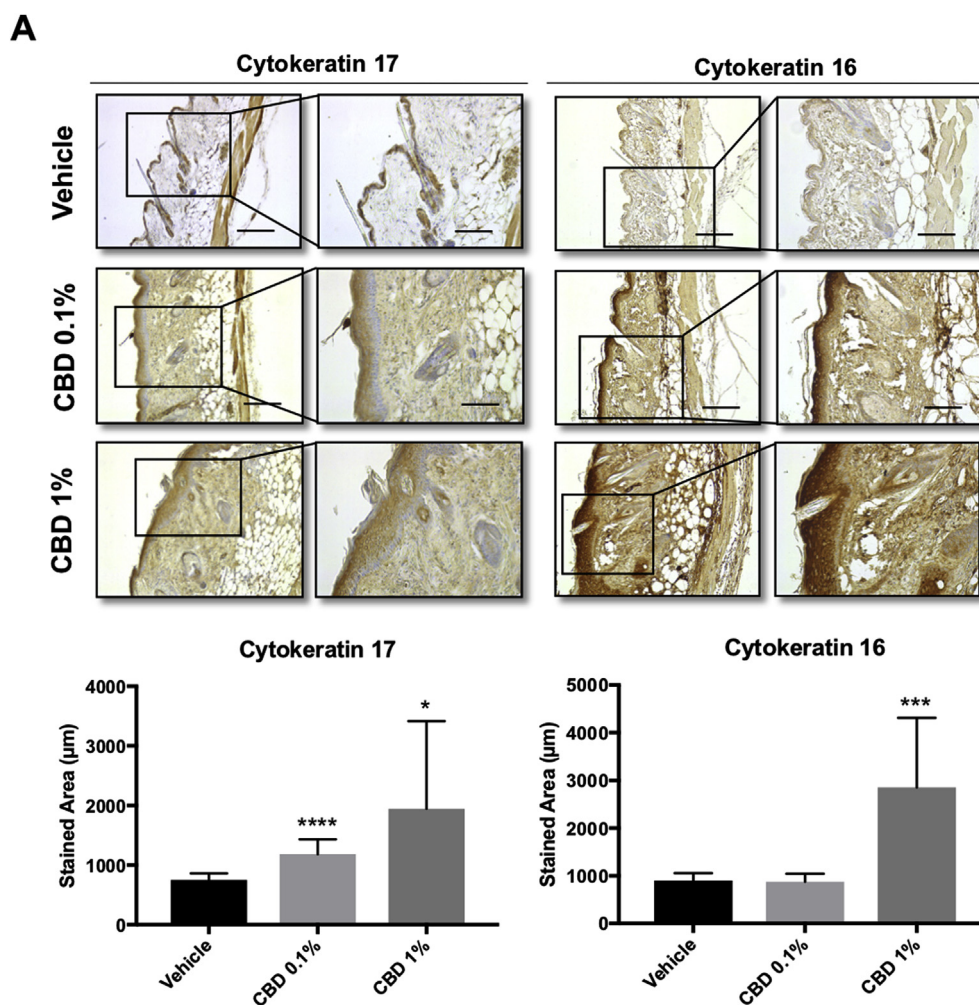


Fig. 7. CBD treatment significantly increases the expression of cytokeratin 17 and 16 in mouse epidermis. (A) Representative images of cytokeratin 17 and 16 immunohistochemistry from mouse skin after 5 days of treatment with vehicle, CBD 0.1% or 1% (B) Quantification of cytokeratin 17 and 16 stained areas in mouse epidermis. * $P < 0.05$, *** < 0.001 compared with control. Scale: 200 (left) and 100 μm (right). $n = 14$ for vehicle treated samples and $n = 10$ for CBD treated samples.

conditions, e.g. eczema or atopic dermatitis.

Previous studies have shown that CBD inhibited differentiation in HaCaT cells [49], and exerted anti-proliferative actions on transformed human keratinocytes [50]. Our system analysis *in vitro* showed an anti-proliferative and pro-differentiation profile for CBD, however, our *in vivo* data showed that CBD induced keratinocyte proliferation measured by an increment in both skin thickness and in the levels of the proliferative keratins K16 and K17. HMOX1 has been suggested to induce keratinocyte proliferation [51], which could explain our results *in vivo*, although we cannot rule out the participation of additional proliferative factors regulated by CBD.

Anecdotal evidence suggested that CBD could be indicated for the treatment of psoriatic plaques. However, psoriasis is characterized by chronic inflammation and keratinocyte hyperproliferation (i.e. with high levels of keratin 16 and 17); therefore, and although CBD has anti-inflammatory effects, we consider that the use of CBD in psoriasis should be taken with caution due to its pro-proliferative effects *in vivo*. Further experiments are required to determine the effect of CBD treatment in psoriatic lesions *in vivo*.

The NRF2 activator SFN has been shown to be beneficial for keratin disorders such as Epidermolysis Bullosa Simplex (EBS). In this context, topical treatment with SFN rescued skin blistering in an EBS mouse model, correlating with the reprogramming of keratin synthesis in epidermis and induction of keratin 16 and 17 [52]. Curiously however,

whereas the SFN-mediated induction of keratin 16 partly depends on NRF2, the induction of keratin 17 is NRF2-independent [53]. Since topical and oral CBD have been used by EBS patients with promising results [22,54] our results provide a mechanistic explanation and support CBD as a promising option for the prevention of the pathological skin fragility occurring in EBS and for improving wound closure.

Regarding the safety used of BACH1 inhibitors, long-term BACH1 deficiency and associated sustained HMOX1 upregulation in *Bach1*^{-/-} mice did not show any detrimental effect under normal conditions [55], which suggest that acute BACH1 inhibition would not have any systemic deteriorative effect under such conditions.

In summary our study demonstrates for the first time a biochemical target for CBD and provides a scientific rationale for its use as a treatment for some skin conditions. Furthermore, recent reports have highlighted the potential value of BACH1 as a therapeutic target in cancer [45,56,57], and thus our study also opens the door for new lines of investigation focused on the potential value of CBD as a cancer therapeutic drug.

Funding

This work was supported by the Medical Research Institute of the University of Dundee, Cancer Research UK (C52419/A22869) (LV) and Tenovus Scotland (T18/07) (LC) and by grant SAF2017-87701-R (EM)

from the Ministry of the Economy and Competition (MINECO) co-financed with the European Union FEDER funds. InnoHealth Group and Emerald Health Biotechnology also supported this work and had no further role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication.

Authors contribution

LC, VG, EM and JAC conducted the *in vitro* experiments, the histopathology and the immuno-histochemistry studies. VG coordinated and conducted, together with AGM and JP, the whole set of *in vivo* experiments, as well as different of the analytical procedures related with those. MGR and MAC conducted the bioinformatic analysis. LC, VG, MGR, EM and JP were responsible for initial data analysis, figure preparation and statistical analysis. LV and EM had a leading contribution in the design of *in vivo* studies, and an active role in the discussion and interpretation of the whole dataset. LV and EM jointly wrote the manuscript as well as by the rest of the authors. All the authors take full responsibility for the work.

Declaration of interests

Eduardo Muñoz is a member of the Scientific Advisory Board of InnoHealth Group and Emerald Health Biotechnology.

Acknowledgements

We would like to thank Prof Giovanni Appendino (Università del Piemonte Orientale, Italy) for providing the non-psychoactive cannabinoids used in this study, and Prof Albena Dinkova-Kostova (University of Dundee, UK) for critical reading and insightful comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101321>.

References

- [1] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol.* 194 (1) (2011) 7–15.
- [2] C.E. Cross, B. Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul, et al., Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.* 107 (4) (1987) 526–545.
- [3] D.R. Bickers, M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *J. Invest. Dermatol.* 126 (12) (2006) 2565–2575.
- [4] K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, et al., Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.* 13 (1) (1999) 76–86.
- [5] M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto, J.D. Hayes, Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression, *J. Biol. Chem.* 278 (24) (2003) 21592–21600.
- [6] M. Kobayashi, M. Yamamoto, Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species, *Adv. Enzym. Regul.* 46 (2006) 113–140.
- [7] K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, et al., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (2) (1997) 313–322.
- [8] M.D. Maines, The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37 (1997) 517–554.
- [9] R. Gozzelino, V. Jeney, M.P. Soares, Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010) 323–354.
- [10] S.M. Keyse, R.M. Tyrrell, Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1) (1989) 99–103.
- [11] S. Dhakshinamoorthy, A.K. Jain, D.A. Bloom, A.K. Jaiswal, Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants, *J. Biol. Chem.* 280 (17) (2005) 16891–16900.
- [12] Y. Shan, R.W. Lambrecht, S.E. Donohue, H.L. Bonkovsky, Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin, *FASEB J.* 20 (14) (2006) 2651–2653.
- [13] J.F. Reichard, G.T. Motz, A. Puga, Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1, *Nucleic Acids Res.* 35 (21) (2007) 7074–7086.
- [14] A.K. MacLeod, M. McMahon, S.M. Plummer, L.G. Higgins, T.M. Penning, K. Igarashi, et al., Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds, *Carcinogenesis* 30 (9) (2009) 1571–1580.
- [15] H.J. Wernatz, D. Schmidt, T. Manke, I. Piccini, M. Sultan, T. Borodina, et al., The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle, *J. Biol. Chem.* 286 (26) (2011) 23521–23532.
- [16] I. Numata, R. Okuyama, A. Memeza, Y. Ito, K. Takeda, K. Furuyama, et al., Functional expression of heme oxygenase-1 in human differentiated epidermis and its regulation by cytokines, *J. Invest. Dermatol.* 129 (11) (2009) 2594–2603.
- [17] R. Capasso, F. Borrelli, G. Avella, B. Romano, C. Scalisi, F. Capasso, et al., Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice, *Br. J. Pharmacol.* 154 (5) (2008) 1001–1008.
- [18] P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, B. Horvath, S. Batkai, O. Park, G. Tanchian, et al., Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrosative stress, and cell death, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (10) (2011) 1368–1381.
- [19] H. Pan, P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, V. Patel, B. Mukhopadhyay, B. Gao, et al., Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328 (3) (2009) 708–714.
- [20] S. Petrosino, R. Verde, M. Vaia, M. Allara, T. Iuvone, V. Di Marzo, Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a nonpsychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 365 (3) (2018) 652–663.
- [21] Y. Ramot, A. Oláh, R. Paus, Cover Image: neuroendocrine treatment of inherited keratin disorders by cannabinoids? *Br. J. Dermatol.* 178 (6) (2018) 1469.
- [22] M.P. Chelliah, Z. Zinn, P. Khoo, J.M.C. Teng, Self-initiated use of topical cannabidiol oil for epidermolysis bullosa, *Pediatr. Dermatol.* 35 (4) (2018) e224–e227.
- [23] A. Juknat, M. Pietr, E. Kozela, N. Rimmerman, R. Levy, G. Coppola, et al., Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Delta9-tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells, *Br. J. Pharmacol.* 165 (8) (2012) 2512–2528.
- [24] A. Juknat, M. Pietr, E. Kozela, N. Rimmerman, R. Levy, F. Gao, et al., Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells, *PLoS One* 8 (4) (2013) e61462.
- [25] D. Del Prete, E. Millan, F. Pollastro, G. Chianese, P. Luciano, J.A. Collado, et al., Turmeric sesquiterpenoids: expeditious resolution, comparative bioactivity, and a new bicyclic turmeronoid, *J. Nat. Prod.* 79 (2) (2016) 267–273.
- [26] L. Torrente, C. Sanchez, R. Moreno, S. Chowdhry, P. Cabello, K. Isono, et al., Crosstalk between NRF2 and HIPK2 shapes cytoprotective responses, *Oncogene* 36 (44) (2017) 6204–6212.
- [27] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (15) (2014) 2114–2120.
- [28] D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg, HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements, *Nat. Methods* 12 (4) (2015) 357–360.
- [29] Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics* 30 (7) (2014) 923–930.
- [30] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (12) (2014) 550.
- [31] M.V. Kuleshov, M.R. Jones, A.D. Rouillard, N.F. Fernandez, Q. Duan, Z. Wang, et al., Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update, *Nucleic Acids Res.* 44 (W1) (2016) W90–W97.
- [32] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. B* 57 (1) (1995) 289–300.
- [33] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D.J. Kundu, et al., The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic Acids Res.* 47 (D1) (2019) D442–D450.
- [34] M. Schafer, S. Werner, Nrf2-A regulator of keratinocyte redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 88 (Pt B) (2015) 243–252.
- [35] T.W. Kensler, P.A. Egner, A.S. Agayem, K. Visvanathan, J.D. Groopman, J.G. Chen, et al., Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane, *Top. Curr. Chem.* 329 (2013) 163–177.
- [36] A.T. Dinkova-Kostova, K.T. Liby, K.K. Stephenson, W.D. Holtzclaw, X. Gao, N. Suh, et al., Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (12) (2005) 4584–4589.
- [37] A. Shrivastava, P.M. Kuzontkoski, J.E. Groopman, A. Prasad, Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy, *Mol. Cancer Ther.* 10 (7) (2011) 1161–1172.
- [38] H.Y. Wu, C.H. Huang, Y.H. Lin, C.C. Wang, T.R. Jan, Cannabidiol induced apoptosis in human monocytes through mitochondrial permeability transition pore-mediated ROS production, *Free Radic. Biol. Med.* 124 (2018) 311–318.
- [39] H. Suzuki, S. Tashiro, S. Hira, J. Sun, C. Yamazaki, Y. Zenke, et al., Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of BACH1, *EMBO J.*

- 23 (13) (2004) 2544–2553.
- [40] Y. Zenke-Kawasaki, Y. Dohi, Y. Katoh, T. Ikura, M. Ikura, T. Asahara, et al., Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor BACH1, *Mol. Cell. Biol.* 27 (19) (2007) 6962–6971.
- [41] I.M. Leigh, H. Navsaria, P.E. Purkis, I.A. McKay, P.E. Bowden, P.N. Riddle, Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro, *Br. J. Dermatol.* 133 (4) (1995) 501–511.
- [42] P.A. Coulombe, X. Tong, S. Mazzalupo, Z. Wang, P. Wong, Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo, *Eur. J. Cell Biol.* 83 (11–12) (2004) 735–746.
- [43] C.D. Rio, E. Millan, V. Garcia, G. Appendino, J. DeMesa, E. Munoz, The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders, *Biochem. Pharmacol.* 157 (2018) 122–133.
- [44] K.F. Toth, D. Adam, T. Biro, A. Olah, Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "C(ut)annabinoid" system, *Molecules* 24 (5) (2019).
- [45] L. Lignitto, S.E. LeBoeuf, H. Homer, S. Jiang, M. Askenazi, T.R. Karakousi, et al., Nrf2 activation promotes lung cancer metastasis by inhibiting the degradation of BACH1, *Cell* 178 (2) (2019) 316–29 e18.
- [46] Y. Ichimura, S. Waguri, Y.S. Sou, S. Kageyama, J. Hasegawa, R. Ishimura, et al., Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy, *Mol. Cell* 51 (5) (2013) 618–631.
- [47] J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, et al., Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene, *EMBO J.* 21 (19) (2002) 5216–5224.
- [48] J. Alam, J.L. Cook, How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36 (2) (2007) 166–174.
- [49] M. Pucci, C. Rapino, A. Di Francesco, E. Dainese, C. D'Addario, M. Maccarrone, Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids, *Br. J. Pharmacol.* 170 (3) (2013) 581–591.
- [50] J.D. Wilkinson, E.M. Williamson, Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis, *J. Dermatol. Sci.* 45 (2) (2007) 87–92.
- [51] J.E. Clark, C.J. Green, R. Motterlini, Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (2) (1997) 215–220.
- [52] M.L. Kerns, D. DePianto, A.T. Dinkova-Kostova, P. Talalay, P.A. Coulombe, Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (36) (2007) 14460–14465.
- [53] M. Kerns, D. DePianto, M. Yamamoto, P.A. Coulombe, Differential modulation of keratin expression by sulforaphane occurs via Nrf2-dependent and -independent pathways in skin epithelia, *Mol. Biol. Cell* 21 (23) (2010) 4068–4075.
- [54] N.H.B. Schrader, J.C. Duipmans, B. Molenbuur, A.P. Wolff, M.F. Jonkman, Combined tetrahydrocannabinol and cannabidiol to treat pain in epidermolysis bullosa: a report of three cases, *Br. J. Dermatol.* 180 (4) (2019) 922–924.
- [55] K. Ota, A. Brydun, A. Itoh-Nakadai, J. Sun, K. Igarashi, Bach1 deficiency and accompanying overexpression of heme oxygenase-1 do not influence aging or tumorigenesis in mice, *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 757901.
- [56] J. Lee, A.E. Yesilkanal, J.P. Wynne, C. Frankenberger, J. Liu, J. Yan, et al., Effective breast cancer combination therapy targeting BACH1 and mitochondrial metabolism, *Nature* 568 (7751) (2019) 254–258.
- [57] C. Wiel, K. Le Gal, M.X. Ibrahim, C.A. Jahangir, M. Kashif, H. Yao, et al., BACH1 stabilization by antioxidants stimulates lung cancer metastasis, *Cell* 178 (2) (2019) 330–45 e22.



Review

The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders

Carmen del Río^{a,b,c,1}, Estrella Millán^{d,1}, Víctor García^{a,b,c,d}, Giovanni Appendino^e, Jim DeMesa^f, Eduardo Muñoz^{a,b,c,*}^a Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain^b Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain^c Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain^d Innohealth Group, Madrid, Spain^e Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy^f Emerald Health Pharmaceuticals, San Diego, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Skin
Cannabinoids
Endocannabinoid system
Skin diseases

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the body and has a complex and very active structure that contributes to homeostasis and provides the first line defense against injury and infection. In the past few years it has become evident that the endocannabinoid system (ECS) plays a relevant role in healthy and diseased skin. Specifically, we review how the dysregulation of ECS has been associated to dermatological disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, scleroderma and skin cancer. Therefore, the druggability of the ECS could open new research avenues for the treatment of the pathologies mentioned. Numerous studies have reported that phytocannabinoids and their biological analogues modulate a complex network pharmacology involved in the modulation of ECS, focusing on classical cannabinoid receptors, transient receptor potential channels (TRPs), and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). The combined targeting of several end-points seems critical to provide better chances of therapeutically success, in sharp contrast to the one-disease-one-target dogma that permeates current drug discovery campaigns.

1. Topical use of *Cannabis sativa*. A historical perspective

The early medical history of Cannabis is confusing and controversial, since difficulties in nomenclatural and transcription plague its identification in ancient texts of *materia medica*. Medicinal properties associated to a fiber plant could be diagnostic for Cannabis, but, in principle, they might also refer to flax (*Linum usitatissimum* L.). The distinction is sometimes difficult, not to mention the unconfirmed occurrence of trace amounts of cannabinoids in flax [1], and many indications remain, in any case, cryptic [2]. This is true even for the Chinese medicinal literature, the richest one of potential references to the uses of Cannabis because of the role of China as a domestication hub for the plant [3]. Despite these limitations, topical uses associated to *bona fide* Cannabis preparations can be identified in the ancient medical

literature [2]. Many of these uses are related to the antibacterial activity of Cannabis [4], whose flower heads (presumably female) were mixed up with honey and applied on wounds [2,4]. Honey has antibacterial properties related to its high contents of sugars, and this osmotic antibacterial mechanism could have been complemented by the more specific antibiotic activity of cannabinoids. In the nineteen fifties, topical preparations of cannabinoids were, indeed, developed in Eastern Europe as non-allergenic skin antiseptic agents [5]. In antiquity, Cannabis was also mixed with fats and applied as a cataplasm to treat skin excrescences (possibly tumors in the modern medical language), bruises, and pain [2,6]. Although cannabinoids show anticancer activity against various malignant cells as well as anti-inflammatory and analgesic properties [7], these uses are mentioned for both the cannabinoid-rich flowerheads and the cannabinoid-devoid roots,

Abbreviations: AEA, anandamide; AD, atopic dermatitis; BLM, bleomycin; CB, cannabinoid receptor; CBD, cannabidiol; CGRP, calcitonin growth related peptide; ECS, endocannabinoid system; FAAH, fatty acid amide hydrolase; HF, hair follicle; MAGL, monoacylglycerol lipase; PEA, palmitoylethanolamide; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SALT, skin associated lymphoid tissue; SSC, systemic sclerosis; Δ^9 -THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol; TRP, Transient receptor potential; TRPV1, Transient Receptor Potential Vanilloid-1

* Corresponding author at: Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba, University of Córdoba, Avda Menéndez Pidal s/n., 14004 Córdoba, Spain.

E-mail address: filimuble@uco.es (E. Muñoz).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.022>

Received 18 June 2018; Accepted 16 August 2018

0006-2952/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

undermining the association of these beneficial effects to specific constituents of the plant [6]. The most controversial topical uses of Cannabis are probably those related to the Holy Oil of the Bible, whose composition contains a plant referred to as *kaneh bosem*. It has been suggested that *kaneh bosem* refers to Cannabis and not to sweet flag (*Acorus calamus* L.) or lemon grass (*Cymbopogon citratus* D.C. Stapf) as currently reported in the modern translation of the Bible [8]. The Holy Oil had both a ritual and a medical use, and is also mentioned in the New Testament as a healing balm (Marc, 16:13; James 5:14), with no association, however, to the treatment of a specific disease.

Overall, the historical record does not provide inspiring clues for the topical modulation of the endocannabinoid system (ECS) in the skin using Cannabis preparations. Some convergences are even paradoxical, like the ones in the Medieval Persian and Chinese records on the beneficial effect of Cannabis leaves on alopecia [9], since CB₁ activation inhibits human hair shaft elongation and promotes its involution [10], while CB₁-antagonists promote hair growth [11].

With the notable exception of the effect of cannabis on juvenile epilepsy [12], these considerations are not at all surprising, since the modern medicinal uses of Cannabis were the results of *reverse pharmacology*, based on the observation of beneficial effects associated to the recreational use of marijuana [2]. There are indeed many claims from medicinal marijuana users that topical Cannabis as a massage oil or as balm can improve skin disorders (eczema, psoriasis, pruritus, contact dermatitis), and treat severe cases of skin infection. In the lack of controlled clinical trials, these claims are of course unsubstantiated, but there is indeed the possibility that topical cannabinoids might exert beneficial effects, and we have critically reviewed data from *in vitro* and animal studies that could support, or question, developments in this area.

2. The endocannabinoid system of the skin

The first modern medical study on *C. sativa* dates from 1832 [13], but knowledge on the bioactive constituents of the plant and on the existence of the endocannabinoid system (ECS) are more recent, and can be traced back to the seminal characterization of the psychoactive principle of the plant (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC), reported in 1964 [14]. Later, the main G protein-coupled membrane cannabinoid receptors, designated cannabinoid type 1 receptor (CB₁) and cannabinoid type 2 receptor (CB₂) were cloned and identified [15,16]. The ECS also comprises the cannabinoids synthesized endogenously by many organisms (endocannabinoids), which are produced on demand from membrane lipids, and the enzymes responsible for their synthesis, transport and degradation. The most studied endocannabinoids are anandamide (*N*-arachidonylethanolamine; AEA) and 2-arachidonylglycerol (2-AG) [17,18] and, although they mainly exert their physiological effects via CB₁ and CB₂, other cell surface and nuclear receptors have also been implicated in cannabinoid signaling (TRPV1, 5-HT, PPAR γ , PPAR α) [19,20]. AEA synthesis is mediated by phospholipase D while 2-AG is synthesized by the action of diacylglycerol lipase (DAGL) [21,22]. The endocannabinoid degradation is mainly carried out by two enzymes, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) [23] (Fig. 1).

The ECS is involved in multiple biological functions, such as learning and memory, ingestion, pain perception, neuroprotection and immune response, among others [24]. Regarding cannabinoid receptors distribution, CB₁ was initially described in the central nervous system (CNS), but was later discovered also in other tissues such as liver, muscle, endothelium and adipose tissue [25,26]. Conversely, the expression of CB₂ was originally believed to be limited to immune cells [16]. On the other hand, further research has shown that the ECS is present also in peripheral tissues. Thus, both cannabinoid receptors as well as the two main endocannabinoids (AEA and 2-AG) and the enzymes responsible for their metabolism are present in healthy and diseased skin [10,27–29].

The skin is the largest organ of the body and has a complex and very active structure that contributes to body homeostasis. ECS is involved in cutaneous function by regulating, among others, cell growth, differentiation and survival [30], immune and inflammatory responses [31–33], and sensory phenomena [34]. Therefore, dysregulation of the ECS could be involved in skin disease, and has been shown to be altered in pathological conditions of the skin like those associated to fibrosis or allergic contact dermatitis [28,35].

Both CB₁ and CB₂ were described in human and mouse skin and dermal appendages with uniform in different body areas. In normal human and mouse skin, the cannabinoid receptors are predominantly distributed in suprabasal layers of the epidermis, hair follicles and sporadic regions of the basal layer [27]. At the cellular level, normal human epidermal keratinocytes and immortalized HaCaT human keratinocytes were found to express CB₁, and that seemingly plays a role in epidermal differentiation [36]. Moreover, CB₁ and CB₂ are both distributed in human keratinocytes as well as in hair follicles and sebaceous glands. CB₁ is localized in keratinocytes from the stratum spinosum and granulosum and also in differentiated sebaceous cells, epithelial cells of the infundibulum and inner root sheath of hair follicles. On the other hand, CB₂ is expressed in basal keratinocytes and undifferentiated sebaceous cells and undifferentiated infundibular hair follicle cells [29]. The expression of CB₁ and CB₂ has also been confirmed in melanocytes [37], dermal fibroblasts [28] and myoepithelial cells of eccrine sweat glands [29].

The skin contains a dense network of nervous and vascular structures, and CB₁ and CB₂ were also identified in skin nerve fibers with a similar distribution profile. Both receptors were immunodetected in large myelinated nerve fiber bundles of the reticular dermis, small unmyelinated nerves of the papillary dermis, and epidermal nerve fibers [29], and the presence and function of cannabinoid receptors has been additionally demonstrated in vascular endothelium [25,38]. Moreover, pre-adipocytes and mature adipocytes are also present in the subcutaneous layer, and have been shown to express functional CB₁ and CB₂ receptors [39].

Different types of skin cells can synthesize AEA and 2-AG. In this sense, a fully functional ECS has been shown in keratinocytes [36], melanocytes [37] and fibroblasts [40,41]. Indeed, low expression of FAAH is detected through suprabasal layers of the epidermis, the outer root sheath of hair follicles, and in skin sebaceous glands [42].

As mentioned above, additional mechanisms are involved in ECS signaling, including receptors such as Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1) and Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). TRPV1 immunoreactivity was described in various cells of human skin. Thus, vanilloid receptors are highly expressed in epidermal basal keratinocytes and, to a lesser extent, in suprabasal keratinocytes. In addition, Langerhans cells, endothelial and vascular smooth muscle cells, sebocytes and sweat gland epithelium were also reported to express TRPV1. Conversely, dermal fibroblasts and melanocytes did not show TRPV1 immunoreactivity [43], while the presence of TRPV1 receptors was further described in epidermal and subepidermal fibers [44]. Within other cell types, the expression of PPAR γ was reported in fibroblasts [45], keratinocytes [46], melanocytes [47] and sebocytes [48].

The skin is the primary barrier to the external environment and has its own immune system comprising both innate and adaptive immune cells. This immune cell network is composed of resident and homing immune cells, and includes dendritic cells, macrophages, mast cells, and B- and T cells. In addition, certain skin cell populations, like keratinocytes or fibroblasts, also interact and cooperate with the immune function [49]. Therefore, the role of the ECS on immune regulation supports its local therapeutic effects in the skin. CB₁ and CB₂ have been found in mast cells and macrophages present in the skin [29] but also their expression in T and B cells is well documented [50]. Although both receptors are involved in immune cells regulation, most of the immune functions of the ECS are mediated by CB₂, given the prevailing

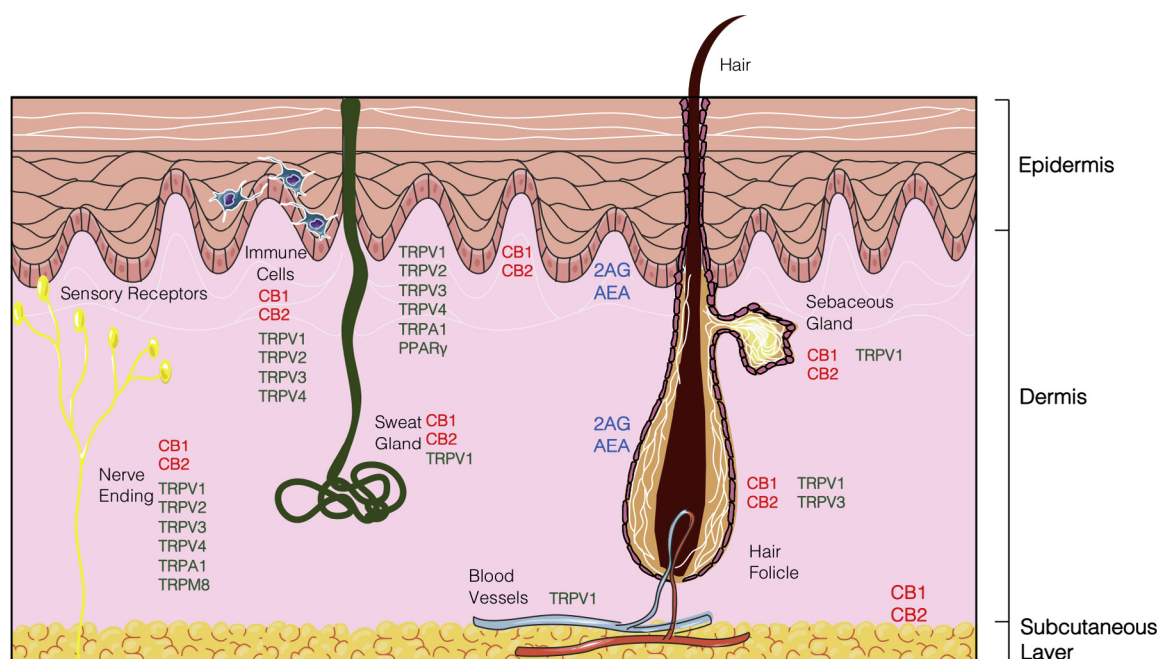


Fig. 1. The endocannabinoid system of the skin. Schematic representation of the key elements (main cannabinoid receptors and their endogenous lipid ligands) of the endocannabinoid system in cellular compartments of the skin.

expression of the CB₂ gene in immune tissues [50].

Therefore, the abundance of ECS elements in the skin and appendages, as well as in nerve fibers and in resident and infiltrating immune cell populations, provides a rationale for evaluating the therapeutic potential of cannabinoids in different skin disorders.

3. Other skin receptors targeted by cannabinoids (TRPs channels)

Transient receptor potential (TRP) channels are cation-permeable channels with six transmembrane segments (S1-S6) and a hydrophilic loop, which forms the ion-conducting pore, located between S5 and S6 transmembrane segments. The intracellular domains, with the carboxyl and amino terminal ends, are the most variable regions within TRP channels. The members of this family are grouped into 6 subfamilies, according to amino acid sequence homology: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin) and TRPML (mucolipin) [51–53] (Fig. 1).

TRP channels are activated by various physical, chemical and thermal stimuli, acting as cellular sensors and allowing the non-selective entry of cations into the cytoplasm [54]. TRP channels are expressed in sensory neurons and also in non-neuronal cell types, and their activation causes various effects, such as changes in membrane potential, ion influx, and alteration of enzymatic activity [55]. It is important to highlight the key role played by these channels in the peripheral and central processing of pain, itching and thermal sensation, whose activation serve as a protective function against harmful agents which are sometimes perceived through their contact with the skin [56–58]. In this sense, multiple studies have demonstrated that TRP channel modulators are a promising strategy for alleviating pain and itch [59–62].

TRP channels play an important role in the regulation of cutaneous functions and their expression has been identified in sensory nerve endings and other skin cells such as keratinocytes, mast cells, Langerhans cells, dermal immune cells, melanocytes, sebocytes, and hair follicle root sheath and bulge [43,63–65]. Under physiological conditions, TRP channels are involved in the formation and maintenance of the skin barrier, cell growth, cell differentiation and cutaneous immunological and inflammatory processes. For example, TRPV1 activation inhibits lipid synthesis in keratinocytes, promoting the

alteration of the epithelial barrier, while TRPV1 antagonists accelerated its recovery [52]. Curiously, the opposite effect was observed with TRPV4, with agonists and antagonists accelerating and delaying, respectively, skin barrier recovery [66]. Indeed, TRPV4 activation favored the development and maturation of cell-cell junctions in keratinocytes [67]. Furthermore, the topical administration of TRPA1 and TRPM8 agonists improved the recovery of epidermal permeability and epidermal proliferation after barrier insults [68,69]. Likewise, the TRPV3 channel is involved in skin barrier homeostasis because it regulates the transglutaminases activity required for keratinocyte cornification [70]. In addition, TRPV1 and TRPA1 activation were related to the production and release of pro-inflammatory mediators in keratinocytes, including IL-1 α , IL-1 β , IL-8 and prostaglandin E₂ [64,71]. Similarly, TRPV1 mediates an inflammatory response that has been observed after UV irradiation in mouse epidermal keratinocytes [72].

Since the discovery that AEA had the ability to activate TRPV1 channels on primary sensory neurons, numerous studies have shown the link between the ECS and the TRP channels [73]. Other endocannabinoids such as *N*-arachidonoyl-serotonin, NADA and endogenous monoacylglycerols act as endogenous TRPV1 modulators [74–77]. Similarly, some phytocannabinoids have been shown to interact and regulate the activity of the TRPA1, TRPV2, TRPV3 and TRPM8 channels, exerting some of their therapeutic effects through them [78,79]. Thus, there is a general agreement that the effects of cannabinoids in the skin are not only dependent on CB₁ and CB₂ activation, but also on several TRP channels, that can be activated or inhibited by natural or synthetic cannabinoids. For example, it has been demonstrated that high concentrations of AEA and Δ^9 -THC are able to induce the release of the vasodilatory and pro-inflammatory neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) in mouse skin by TRPV1 channel activation [80]. Likewise, AEA was able to promote apoptosis in human epidermal melanocytes through the mediation of this receptor [37].

4. The endocannabinoid system in hair follicle

The hair follicle (HF) is a characteristic mammalian organ with important function on survival and reproductive success for some species. The HF has a high regeneration potential and, with the exception

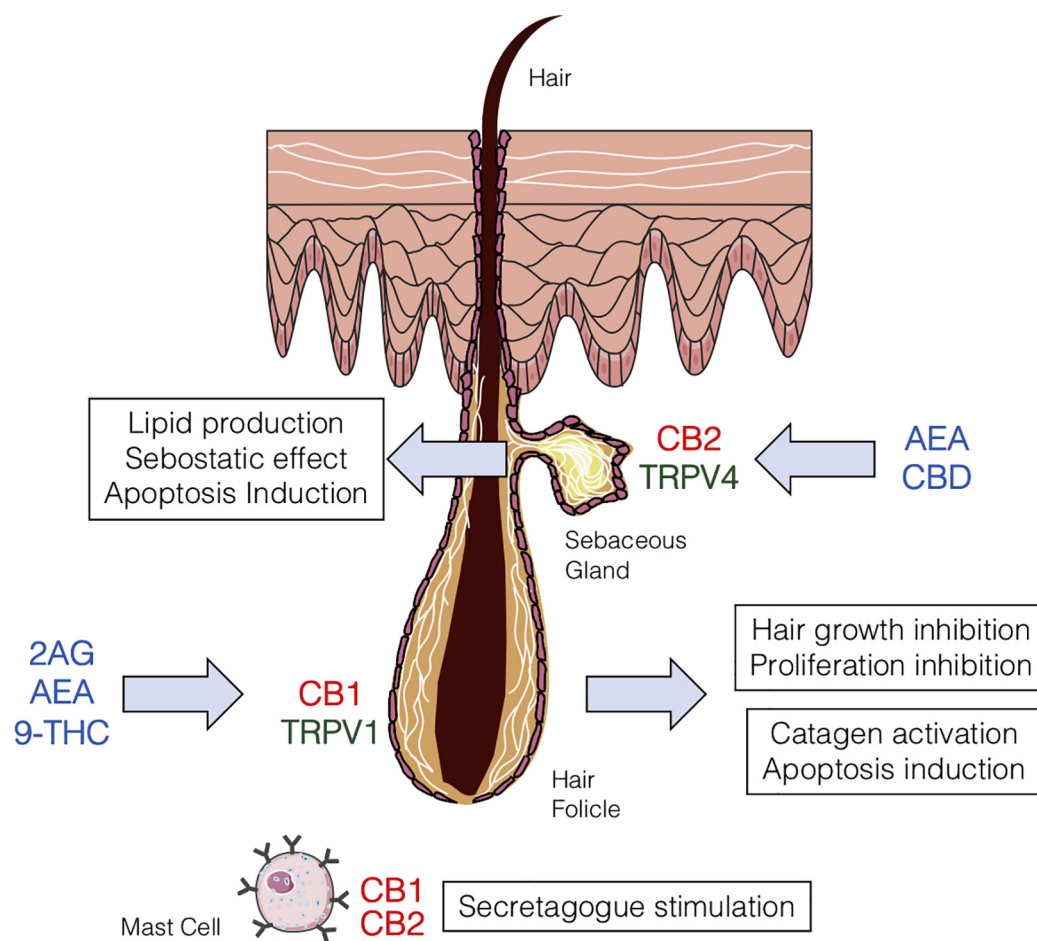


Fig. 2. The endocannabinoid system in hair follicle. Diagram representing the role and consequences of the endocannabinoid system on hair follicle function.

of the pigmentary unit, is very resistant to aging. The pilosebaceous unit, an important skin structure in thermoregulation and environmental protection, is formed by the HF, the sebaceous gland, the apocrine sweat gland and the erector pili muscle [81]. The HF is periodically regenerated during the hair growth cycle which consist of three different phases: a rapid and energy-consuming growth phase (anagen), a cell apoptosis regression phase (catagen) and a quiescent period (telogen) during which the HF prepares for the next cycle [82] (Fig. 2).

The HF has been described as a neuroendocrine organ and is the target as well as the source of multiple neuromediators [82]. The relevance of endocannabinoids as neuroendocrine modulators is well established [83], and some studies have provided solid evidence for a role for the ECS on HF regulation. Although the expression of CB₂ was described in undifferentiated infundibular hair follicle cells [29], only CB₁ (but not CB₂) immunoreactivity was found in the HF epithelium of the outer root sheath [84]. Moreover, the expression of CB₁ in the HF is dependent on the hair cycle and is upregulated during catagen [84]. The activation of CB₁ on human HF by endogenous (AEA) or exogenous (Δ^9 -THC) ligands inhibited hair shaft elongation, and the hair matrix keratinocytes proliferation was paralleled by a corresponding increase of keratinocytes apoptosis in the epithelial hair bulb, overall inducing HF catagen. These observations are in line with preliminary data that show the presence of AEA and 2-AG in the HF [84], with AEA negatively regulating growth and inducing cell death in epidermal keratinocytes and human skin organ cultures via a CB₁- and a subsequent TRPV1-dependent mechanism [30]. In principle, CB₁ antagonists could therefore promote hair growth, and a study was done on the effect of the CB₁ antagonist Rimonabant and a close analogue on hair growth. Modest effects on hair growth were observed with the

analogue, but not with Rimonabant itself [11], and further research is needed to critically evaluate the potential CB₁ antagonists as hair growth stimulators.

The effect of TRPV1 stimulation on hair growth has also been investigated. TRPV1-expression is restricted to the HF epithelium, and significantly increases when HF undergoes catagen. Capsaicin activation of TRPV1 inhibited hair shaft elongation through the reduction of matrix keratinocytes proliferation and apoptosis upregulation [85]. Despite their share of some ligands, the ECS and the endovanilloid systems seem to act independently, and their modulation is therefore expected to produce synergic rather than additive effects on hair growth [84].

Sebaceous glands contribute to HF function, and have been suggested to participate in initiating or accelerating HF damage [86]. The loss of sebaceous glands, and an increase in the sebaceous gland area associated with their multilobulation, has been described in different types of alopecia [86,87]. In fact, cultured outer root sheath cells, derma papilla cells and organ culture hair growth were negatively affected by nevus sebaceous sebocyte conditioned medium, and sebaceous gland hamartomas presented as hairless patches [88]. Low AEA concentration influenced the sebaceous gland to induce lipid production, while high concentrations increased sebocyte apoptosis via CB₂-coupled MAPK signaling [89]. Conversely, CBD showed a sebostatic effect by inhibiting MAPK activation through TRPV4 agonism [90].

The hair cycle is influenced by mast cell location and granulation status via their secretagogue stimulation of premature anagen and degranulation inhibitor-induced catagen delay [91,92]. CB₁ and CB₂ are expressed in various mast cell lines and cannabinoids exposure to mast cells results in the activation of key signaling pathways. Blockade of

CB₁ signaling has been reported to increase degranulation of human mucosal and connective tissue sheet-derived mast cells without affecting their proliferation *in situ*, while CB₁ knockdown significantly upregulates mast cell number and degranulation [93,94]. However, stimulation with a CB₁ agonist did not affect mast cell number or granulation status, suggesting that continuous CB₁ constitutive stimulation by endocannabinoids in scalp HFs is required to maintain mast cell number and activation at a low baseline level [94]. Activation of CB₂ has been shown to reduce mast cell degranulation *in vivo* [95,96]. However, CB₂ activation did not affect mast cell degranulation *in vitro*, suggesting that the effect of CB₂ agonists *in vivo* could be attributed to an indirect mechanism on mast cells [96].

Taken together, these studies show that the modulation of the ECS has a profound effect on HF as well on other elements of the pilosebaceous unit, but the exploitation of this pharmacological potential for the management of hair growth disorders requires further work.

5. Infection and immunity

Skin is the first defence barrier against physical and chemical agents as well as microbial pathogens. In this sense, dermis, epidermis and immune cells act in a coordinated way to protect our body. Skin associated lymphoid tissue (SALT) was first described by Streilen in 1978, and it is formed by keratinocytes, Langerhans cells, T lymphocyte, melanocytes, macrophages and mast cells [97]. This tissue is capable of triggering an immune response when skin is exposed to pathogens, showing that skin is not merely a physical barrier but also part of immune system. Several studies have demonstrated the important role of the ECS in immune response, although many aspects of its activity remain unclear [98–101]. It has been reported that CB₁ and CB₂ receptors are expressed in the most important components of the immune system, with levels of CB₂ being higher than those of CB₁ receptor [50]. Also other SALT components express cannabinoid receptors, furthering the link between ECS and immune system [27,29,36].

CB₁ modulates pro-inflammatory cytokines in keratinocytes, as shown by the increased release of CXCL10 and CCL8 by hapten-specific T-cells in a model of contact allergic inflammation lacking CB₁-receptor [102]. Other chemokines are also modulated by the ECS. Thus, AEA decreased TNF- α , IL-12 p40, IL-12 p70 and IL-23 levels in immortalized human keratinocytes (HaCaT) as well as in normal human keratinocytes (NHEK) cells activated by IFN γ . Likewise, AEA caused a decrease of IFN γ and IL-17 production in cocultures of Th1 and Th17 lymphocytes plus keratinocytes, and this effect was prevented by a selective CB₁ antagonist [33]. All these observations support a protecting role for CB₁ against excess T-cell inflammatory response in keratinocytes [103].

Mast cells are SALT constituent involved in skin disorder triggered by inflammatory stimuli produced by serine proteinases, histamine, lipid-derived mediators, cytokines, chemokines and growth factors and immune cells activation [104]. Topical treatment with a CB₁ agonist on the back skin of hairless mice with atopic dermatitis induced by oxazolone caused a decrease in mast cell infiltration in skin and histamine inhibition in blood. Conversely, CB₁ receptor inhibition produced an increase in the number of these cells. Taken together, these results suggest mast cells maturation and function are regulated by ECS [105].

Other studies have associated the ECS to other immune cells of the skin such as lymphocytes, dendritic cells and macrophages. Thus, CB₂ receptor suppression impaired the generation of splenic memory T cells, peritoneal B cells and intestinal natural killer lymphocytes in mice [106]. Furthermore, AEA, 2-AG, FAAH, CB₁ and CB₂ receptor expression have been detected in resting and differentiated dendritic cells [107]. Dendritic cells were recruited during innate immune response by 2-AG intradermal injection, acting as chemoattractant *in vivo* [108]. Finally, AEA and 2-AG could increase LPS-induced NO, PGE₂ and IL-6 release in macrophages through CB₂ activation, while 2-AG generated PGE₂ which participates in the positive modulation of iNOS and COX-2 induction [109].

Altogether, these studies indicate the importance of ECS in the modulation of immune system, but the role of phytocannabinoids during microbial infection is still controversial. Several studies support the idea that cannabinoids suppress the immune response. It has been observed that marijuana smoking produced a lower defence against *Staphylococcus aureus* in the lungs [110]. Δ^9 -THC also reduced CD4 lymphocyte and promoted HIV replication [111], while Δ^9 -THC and AEA exerted an immunosuppressive activity via CB₂ receptor [112]. Conversely, it has also been suggested that cannabinoids promote the elimination of infectious agents because of their antimicrobial activity [4]. Remarkably, CB₁ knockout mice were unable to develop LPS-induced fever and the secretion of proinflammatory cytokines [113].

In summary, evidence exists that the ECS strongly affects the skin immune system. Pharmaceutical approaches targeting the ECS are therefore a promising strategy for the management of immunity-related skin disorders.

6. The endocannabinoid system and skin disorders

6.1. Atopic dermatitis

Atopic dermatitis (AD) is a common chronic inflammatory skin disease with a multifactorial pathophysiology that involves skin barrier function, the cutaneous microbiota as well as genetic, environmental, and immunological alterations. The first line treatment of AD is based on topical therapies with corticosteroids or calcineurin inhibitors. However, systemic therapies including cyclosporine, methotrexate, or mycophenolate mofetil are necessary for severe AD forms [114]. Potential treatments and targets for AD include controlling epidermal barrier function alterations, targeting the AD associated Th2 differentiation, blocking IgE binding and reducing mast cells and histamine release, among others [115]. In this context, pharmacological manipulation of the ECS could represent an interesting approach to modulate inflammation and immunity, as well as epidermal barrier function.

The epidermal barrier of the stratum corneum consists of flattened cells that represent the final stage of keratinocyte differentiation (corneocytes). Epidermal keratinocyte differentiation is defective in AD, allowing the penetration of allergens and their subsequent interaction with dendritic cells [116]. Several lines of evidence indicate that the ECS plays a role also in the regulation of human epidermal homeostasis. For example, AEA has reduced human keratinocyte growth and induced cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* through CB₁ and TRPV1 receptors [30]. Moreover, treatment with AEA reduced keratinocyte differentiation *in vitro* by a CB₁-dependent mechanism, while differentiated keratinocytes caused up-regulated FAAH levels and AEA uptake [36]. Mice with global CB₁ deletion, or specifically lacking CB₁ in keratinocytes, exhibited enhanced contact hypersensitivity and delayed epidermal barrier repair in a mouse model of AD. In addition, CB₁^{-/-} keratinocytes released higher levels of thymic stromal lymphopoietin, an important mediator in Th2 differentiation during AD development, highlighting the role of CB₁ receptors in epidermal homeostasis and inflammation in AD [117]. Similarly, CB₁ knock-out mice showed a delay in both barrier recovery and epidermal differentiation and exhibited increased epidermal keratinocyte proliferation whereas CB₂ knock-out improved barrier recovery and epidermal differentiation and decreased proliferation. This suggests a positive impact of CB₁ activation and a detrimental effect of CB₂ signaling for pathologies characterized by an abnormally differentiated epidermis with altered epidermal permeability barrier function [118]. In this sense, the topical application of the CB₁ receptor agonist α -oleoyl oleoylamine serinol accelerated epidermal barrier recovery and reduced inflammation in acute and chronic models of AD [119]. The role of the ECS on epidermal homeostasis is also supported by the changes observed in cannabinoid receptor expression during keratinocyte differentiation [36].

Besides the effects on keratinocyte function and epidermal barrier, the ECS has been also described to exert immunomodulatory activities

in allergic contact dermatitis models. Mice lacking both CB₁ and CB₂ receptors, or independently treated with either CB₁ or CB₂ receptor antagonists showed exacerbated cutaneous allergic inflammation in the DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) model of allergic dermatitis, supporting a role of both receptors in this disease. In the same study, FAAH deficient mice presenting higher levels of endocannabinoids were also protected against DNFB-induced allergic inflammation. Moreover, systemic and topical administration of Δ^9 -THC reduced cutaneous hypersensitivity in this model while the CB₂ specific agonist HU-308 increased the allergic response [120]. However, a subsequent study based on topical treatment with Δ^9 -THC reduced allergic and inflammatory phenomena in wild type and CB₁ or CB₂ knockout mice, suggesting the involvement of other receptors, like TRPA1, GPR55 or PPARs [102]. In stimulated HaCaT keratinocytes, cannabidiol (CBD) has been reported to inhibit the production of MCP-2, a chemokine involved in the inflammatory pathway underlying contact allergic dermatitis, and this effect seems to be mediated by CB₁ and TRPV1 receptors [121]. In addition, repeated administration of the CB₂ receptor inverse agonist JTE-907 reduced the spontaneous scratching behavior of mice developing chronic dermatitis, probably by an indirect mechanism [122].

Palmitoylethanolamide (PEA), an endogenous fatty acid amide belonging to the same chemical class of AEA but lacking cannabinoid receptor ligand activity, has also been reported to show skin anti-inflammatory activity. Thus, PEA could reduce MCP-2 production *in vitro*, while systemic treatment with PEA inhibited DNFB-induced ear inflammation by a TRPV1 mediated mechanism in a mouse model that mimics the early phase of contact dermatitis [123]. In the late stage of allergic contact dermatitis, treatment with PEA was shown to reduce skin thickness, mast cell infiltration and scratching behavior by a mechanism involving CB₂ activation [124].

The connection between the ECS and cutaneous immunity is evident, and represent a therapeutic approach for skin diseases [35,125]. The immunological hallmark of AD is a Th1/Th2 imbalance toward Th2 cells differentiation during the initial phase of inflammation, while Th1 cells are increased in chronic dermatitis [126]. Δ^9 -THC has been shown to regulate human T cell activation and shift the balance of cytokines and the differentiation status of activated T cells in favor of a Th2 cytokine response through CB₂ activation [127]. Similarly, it was described that AEA induced a dose-dependent reduction of human T cell proliferation, significantly suppressing the release of various cytokines. AEA-Induced immunosuppression was CB₂-dependent, and similar results were obtained with the CB₂ selective agonist JWH-015, whose activity was blocked by SR144528, a CB₂ antagonist [128]. Although CB₂ expression in immune cells is higher and most of the anti-inflammatory and immunomodulatory effects seem to be CB₂-mediated, CB₁ receptor may also influence T cells function [129]. Activation of CB₁ and CB₂ induced a short decrease in cAMP followed by a sustained cAMP increase that is responsible for inhibiting T cell activation and proliferation [125,130]. Moreover, increased levels of IL-4 in the skin of mice with atopic dermatitis were normalized after treatment with a CB₁ agonist [119].

Differentiation of Th2 cells also influences keratinocytes through the release of different cytokines such as IL-4 and IL-13. These cytokines destabilize cutaneous barrier function by suppressing the expression of keratins, filaggrin and desmosomal cadherins [131]. Therefore, targeted manipulation of the ECS during the different phases of AD could be beneficial in controlling the inflammatory and immune responses and the subsequent changes in keratinocytes, with an overall beneficial effect on the preservation of the epidermal barrier function (Fig. 3).

6.2. Psoriasis

Psoriasis is a chronic skin disease whose pathogenesis involves hyperkeratotic plaques usually localized at the scalp, elbows, knees and buttock, and characterized by skin inflammatory infiltrates, epidermal hyperplasia, and dysregulated keratinocytes differentiation as well as

hypervascularity in the dermis [132]. The molecular mechanism(s) involved in psoriasis are not completely understood, but the disease involves different immune cells, including dendritic cells, Th1 and Th17 lymphocytes interacting with keratinocytes. Psoriasis can be explained by immune dysregulation toward Th1/Th17 differentiation, that plays a critical role in the development of the disease [133]. In most cases, psoriasis develops in a mild to moderate form, and its current management includes topical treatments as the first choice, and phototherapy, systemic agents or the combination of different therapeutic categories for the advanced cases [134].

The use of cannabinoids for the treatment of psoriasis is based on the anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of some of these compounds. Thus, JWH-133, a synthetic CB₂ cannabinoid with anti-angiogenic activity *in vitro* and *in vivo* [132], could reduce skin tumor vascularization and decreased expression of proangiogenic factors [27], and CB₂ agonists were also shown to attenuate, in a dose-dependent manner, vascular smooth muscle proliferation and migration promoted by TNF α [135]. Cannabinoids suppress inflammation by different mechanisms, including pro-apoptotic effects on immune cells, reduction of cell proliferation, modulation of cytokine production, and induction of T-regulatory cells [136]. Furthermore, cannabinoids also exerts differential effects on the control of keratinocytes proliferation and differentiation [30,36,118], as discussed in 6.1, while psoriatic skin expression of PPAR γ is decreased, and topical administration of PPAR γ agonists reduced epidermal hyperplasia in organ culture, transplant mouse models, and patients with chronic psoriasis [46].

The activity of the ECS on human keratinocyte growth and differentiation includes mechanism(s) CB₁- and CB₂-dependent and independent as well as TRPV1 and PPAR γ receptors, and their ability to target inflammation and angiogenesis support a potential role for cannabinoids in the treatment of psoriasis (Fig. 3).

6.3. Fibrotic disorders

Systemic sclerosis (SSc) or scleroderma is an autoimmune multi-organic complex connective tissue disease associated with high mortality [137]. SSc patients fall into two clinical forms: limited cutaneous (lcSSc) and diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc). The lcSSc form is characterized by the involvement mainly of the skin and the predominance of vascular complications over fibrosis. The damage to internal organs occurs later and is less severe. On the other hand, the dcSSc is the most severe form of the disease and involves extensive skin fibrosis, accompanied by the involvement of internal organs such as the lungs, kidneys and esophagus, among others [138]. Although the pathophysiology of the disease is not completely understood, it is known that SSc is the result of three main pathological processes: [1] innate and adaptive immune response that promotes the production of auto-antibodies, [2] microvascular endothelial cell damage and [3] fibroblast dysfunction leading to excessive accumulation of collagen and other elements of the extracellular matrix contributing to fibrosis, that is the hallmark of SSc [138].

The main feature of SSc is the hardening of the skin, and the ECS has been identified throughout different cell populations in both mouse and human [28,39]. The ECS plays a role in all the critical processes involved in the development of SSc, from angiogenesis [10] to cellular differentiation and apoptosis [28,36], metabolism and immune function [127,139].

Cannabinoids exert immunosuppressive and anti-inflammatory activity on the immune system. A misbalance between Th1/Th2 polarization biased toward Th2 differentiation has been described in SSc [140]. In addition, Th17 cells are more frequent in SSc patients than in healthy controls [141], and cannabinoids were shown to modulate the development of Th phenotypes [127]. In this sense, CB₂ activation reduced Th17 differentiation and consequently inhibited fibrogenesis in a mouse model of liver fibrosis [139]. Macrophage and mast cell degranulation also represents an important source of profibrotic factors

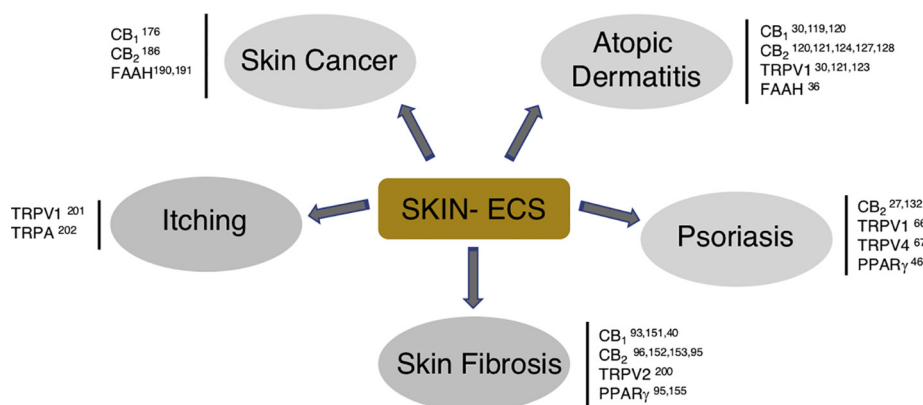


Fig. 3. Potential ECS pharmacological targets for the treatment of skin diseases. Key references are indicated.

during fibrosis [142,143], and activation of mast cells was prevented by CB₁ blockade [93], whereas selective CB₂ agonists reduced mast cell degranulation *in vivo* [96].

The ECS also regulates vascular endothelium function. CB₂ agonists have been described to modulate endothelial cell activation and downregulate the expression of cell adhesion molecules such as Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) [144]. On the other hand, CB₁ agonists reduced endothelial cell proliferation and migration induced by PDGF [145]. Moreover, the endocannabinoids AEA and virodhamine showed vasorelaxant activity via cannabinoid receptor dependent and independent mechanisms [146,147].

The antifibrotic effects of some cannabinoids could be attributed to different signaling pathways, both dependent and independent of cannabinoid receptors. The fibroblast resistance to apoptosis is a characteristic feature in SSc [148]. In this context, CBD has been reported to promote the apoptosis of activated hepatic stellate cells, the main effector cells during hepatic fibrogenesis. The antifibrotic effect of CBD was induced by endoplasmic reticulum stress in a CB₁- and CB₂-independent mechanism [149]. High concentrations of AEA also induced necrosis of hepatic stellate cells, but not of normal hepatocytes [150]. Moreover, treatment with WIN 55,212-2, a synthetic cannabinoid with agonistic activity for both cannabinoid receptors, increased SSc fibroblast apoptosis without affecting healthy fibroblasts, and this effect was not reverted in the presence of selective cannabinoid receptor antagonists [28].

It is important to remark that both cannabinoid receptors are overexpressed in SSc fibroblast, and that they have shown opposite effects on fibrosis development [28]. CB₁ deficient mice were protected against experimental fibrosis by an indirect mechanism through the reduction of leukocyte infiltrates in the skin [151]. The inflammatory infiltrate release different cytokines, like IL-4 and IL-13, which promote the synthesis of collagen by fibroblasts [140]. Blocking CB₁ would be beneficial in the early stages of SSc where inflammation is a predominant phenomenon and consistently, CB₁ inactivation did not reduce inflammation-independent fibrosis in TSK-1 mice. Accordingly, the activation of CB₁ exacerbated mouse experimental fibrosis induced by bleomycin (BLM) [151], and FAAH knockout mice with higher levels of endocannabinoids were more susceptible to BLM-induced fibrosis via CB₁ activation [40]. Moreover, SSc fibroblasts showed decreased levels of FAAH [40]. On the contrary, CB₂ activation was described to protect against fibrosis and reduced inflammatory infiltrates in experimental models of SSc. Thus, treatment with JWH-133 inhibited fibroblast proliferation, immune reaction as well as the subsequent skin and pulmonary fibrosis caused by hypochlorous acid administration [152], and also reduced BLM-induced dermal fibrosis [153]. Moreover, it has been shown that JWH-133 reverses pre-existing fibrosis in cirrhotic rats [154]. VCE-004.8 and ajulemic acid, which behave as dual agonists of

PPAR_γ and CB₂, prevented the development of fibrosis *in vivo* in two complementary models of BLM-induced SSc [95,155]. Indeed, VCE-004.8 antifibrotic effect was partially abrogated by blocking either CB₂ or PPAR_γ receptors [95], and these results are in agreement with other studies showing that genetic and pharmacological inhibition of CB₂ increases susceptibility to skin fibrosis [153].

The effect on PPAR_γ could also explain the antifibrotic potential of various cannabinoids, such as AEA, ajulemic acid or VCE-004.8 [20,28,95,156,157]. PPAR_γ has immunomodulating activity, inhibiting T cell proliferation [158], reducing Th17 differentiation [159,160], and promoting Treg differentiation [161]. Furthermore, PPAR_γ ligands were reported to increase B cell apoptosis [162] and modulate macrophage differentiation and cytokine production [162–166]. In addition to the effects on the immune system, PPAR_γ has also been described to negatively regulate TGFβ-induced collagen synthesis by competing for the transcriptional coactivator p300 [167]. Accordingly, SSc fibroblasts showed reduced PPAR_γ expression and PPAR_γ ligands normalized its expression levels, attenuating fibroblast activation and differentiation [168]. In addition, many PPAR_γ agonists, including cannabinoids, were shown to reduce inflammation and prevent fibrosis in different mouse models of SSc [155,157,169].

The ECS regulates many functions through mechanisms dependent and independent of CB₁ and CB₂ receptors. These effects include the control of inflammation, modulation the innate and adaptive immune response and participation in vascular function and fibrogenesis. Taken together activation of CB₂ and PPAR_γ receptors and CB₁ blockade by cannabinoids are postulated as very attractive therapeutic options for SSc (Fig. 3).

6.4. Skin cancer

Skin cancer comprises non-melanoma skin cancer (NMSC) and melanoma, are among the most common types of malignancies in white-skinned populations. Melanoma, the deadliest form of skin cancer, is originated from the malignant transformation of melanocytes, which are the cells responsible for pigmentation and photoprotection [170]. Australia, North America and Europe are the regions with the greatest melanoma incidence and mortality rates [171]. In fact, in 2018, it has been estimated that 91,270 new cases and 9320 deaths are expected to be diagnosed in the United States [172]. Ultraviolet radiation exposure is the greatest environmental risk factor for melanoma development, accounting for the increase in its incidence over the past several decades [173].

The use of cannabinoids as palliative agents in cancer patients is known, since they have been shown to be effective for pain inhibition, appetite stimulation and reduction of chemotherapy-induced nausea and vomiting [174]. Additionally, changes in circulating plasma levels of endocannabinoids have been found in metastatic melanoma mouse

models as well as in patients with metastatic melanoma, suggesting a correlation between the ECS and melanoma progression [175]. It has been reported that melanoma cells express CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors [176]. The absence of CB₁ and CB₂ receptors has resulted in a decrease in UVB-induced inflammation and skin carcinogenesis. These results suggest that these receptors are necessary for the induction of the pro-inflammatory cascade-dependent tumor development in response to UVB [177].

Immunotherapy is the most effective therapeutic modality of melanoma and, although the ECS plays a role on immunoregulation, there are not clear evidence about the immunotherapeutic use of cannabinoids for skin cancer treatment. However, according to numerous studies, there is increasing evidence that cannabinoids and endocannabinoids are potential anticancer agents because of their ability to inhibit tumor growth and progression of several types of cancers, including melanoma [178–181]. However, there is controversy in the antitumor role played by cannabinoids and the ECS in cancer because their immunomodulatory effects can suppress anti-tumor immune response in some cellular contexts [182,183]. Some cannabinoids might, paradoxically, even increase the proliferation of cancer cells, promoting tumor progression [184].

Synthetic cannabinoids, phytocannabinoids, and endocannabinoids are currently investigated as potential therapeutics for skin cancer. In melanoma cells, dual CB₁/CB₂ receptor agonists such as Δ^9 -THC and WIN-55, 212-2 exerted anti-proliferative effects due to cell cycle arrest at the G₁/S transition, an effect mediated by p-Akt inhibition. Furthermore, the administration of a CB₁ agonist was able to reduce notably the tumor volume and the number of metastatic nodules in melanoma mouse model [176]. In another study it has been demonstrated that Δ^9 -THC leads to cell death by autophagy in both *in vitro* and *in vivo* models of skin cancer. Indeed, Δ^9 -THC-induced autophagy and cell death was prevented by the co-treatment with chloroquine and knockdown of Atg7 [185]. In accordance with these observations, stimulation with WIN-55, 212-2 and JWH-133 of the tumorigenic epidermal cell lines PDV.C57 and HaCa4 decreased their viability and induced apoptosis, and treatment with these cannabinoids reduced the size of blood vessels and the expression of proangiogenic factor (VEGF, placental growth factor and angiopoietin 2) in a melanoma xenograft mouse model [27]. Furthermore, CB₂ activation by JWH-133 decreased adhesion and transmigration of melanoma cells through blood-brain barrier, suggesting the ability of this cannabinoid to prevent brain metastasis [186]. These antitumor effects have also been described for endocannabinoids like AEA, which are cytotoxic to A375 melanoma cells and JWF2 keratinocytes, an effect mediated by cyclooxygenase-2 and lipoxygenases-derived products and the activation of CB₁ and GPR55 [187–189]. In another study AEA induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in NMSC. Nevertheless, these effects were not mediated by cannabinoid and TRPV1 receptors [190]. Similarly, PEA is an endogenous ligand associated with the ECS, which exerts its effects without binding to the CB₁ and CB₂ receptors. Increased PEA levels through direct administration, or by the inhibition of its FAAH-mediated hydrolysis, promoted cell death and decreased tumor progression in melanoma in both *in vitro* and *in vivo* models [191].

Overall, cellular and animal model studies have shown the potential of cannabinoids for the treatment of cancer, and modulation of the ECS has emerged as a most promising strategy for the reduction of skin cancer progression. There is, however, a lack of preclinical and clinical studies robust enough to obtain conclusive evidences in this area [192–194] (Fig. 3).

7. TRPs targeting

The involvement of TRPs in the development of specific skin diseases combines with their role to generate pain and itching, making this class of ion channels attractive targets for dermatological conditions. Cannabinoids and endocannabinoids gate at least five distinct TRP

channels [195], and the co-expression of cannabinoid receptors and TRPVs suggests that functional interaction between the endocannabinoid and the endovanilloid systems is important for skin health. Dual agents capable to modulate both ECS targets and TRPs have therefore the potential to correct the pathological consequences of an imbalances between the two systems, as suggested by a study on an *in vitro* model of allergic contact dermatitis (ACD), where the anti-inflammatory activity of CBD in HaCaT cells was antagonized by selective CB₂ and TRPV1 antagonists [121]. Several natural phytocannabinoids can target both ECS and TRPs end-points. Thus, CBD, Δ^9 -THCA, Δ^9 -THC, CBG and their lower homologues (CBDV, THCV, CBGV) activate and desensitize TRPV1, cannabichromene (CBC), CBD, Δ^9 -THC and cannabiol (CBN) are potent, non-covalent activators of TRPA1, and CBG and THCV inhibit TRPM8. Remarkably, Cannabis extracts containing a variety of different cannabinoids consistently outperformed single purified cannabinoids, suggesting a synergic activity within the “cannabinome” present in the plant extracts [196]. In many cases, potent activity was also observed for the acidic precursors of the cannabinoids, the native form in which these compounds occur in cannabis [196].

Cannabinoids can attenuate cutaneous neurogenic inflammation by inhibiting CGRP release, and treatment with the synthetic cannabinoid agonist WIN 55,212-2 could inhibit CGRP exocytosis induced by capsaicin [197,198]. Cannabinoids can also exert genomic effects on TRPs, as shown for CBD, that could increase the expression of TRPV2 and stimulate its translocation to the cell membrane, with an overall increase of the TRPV2 tone [199]. On the other hand, TRPV2 antagonists, rather than agonists, seems to be interesting for skin function, since the blockage of this ion channel ameliorates wound healing by inhibiting the release of TGF- β 1 release and the differentiation of dermal fibroblasts [200]. The use of TRPV1-targeted cannabinoids could, in general, be beneficial for skin diseases characterized by keratinocyte hyperproliferation, like psoriasis, as well as in keratinocyte-derived skin tumors. In this sense, AEA could inhibit keratinocyte proliferation and increase apoptosis in human keratinocytes through TRPV1 and CB1 pathway [30]. Both the histamine-independent and the histamine-independent scratching behavior requires TRPV1 and TRPA receptors located in nerve endings [201,202], and it is likely that endocannabinoids inhibit it by modulating TRP channels. Also, of relevance is the observation that the endogenous endocannabinoid PEA enhances 2-AG and exerts anti-inflammatory activity by down-regulating the chemokine MCP-2, reducing DNFB-induced ear inflammation in an ACD model. This protective action is the result of an increase of PEA levels mediated by the upregulation of TRPV1, as shown by its reversion with a TRPV1 antagonist [123,203]. A significant reduction of skin allergic wheal reactions was also observed in a canine model of allergic dermatitis induced by hypersensitivity to *Ascaris suum* after oral administration of PEA [204].

The anti-acne activity of CBD was traced to activation of TRPV4, leading to interference with the ERK1/2 MAPK pathway. When assayed in human sebocytes, CBD reduced lipid synthesis promoted by arachidonic- and linoleic acids, also decreasing their proliferation [90]. In addition, in human SZ95 sebocytes, other phytocannabinoids (CBC, THCV, and CBDV) could also inhibit sebaceous lipid production, reducing proliferation and alleviating inflammation [205]. Compounds targeting both TRPs and CBs have emerged as important lead structures and drug candidates for the management of numerous skin diseases, and the time seem ripe for the clinical validation of the promising results observed in cell cultures and disease animal models.

8. Conclusions

In summary, the ECS plays an important role in the regulation of the physiology of the skin, included the HF and the immune system. The dysregulation of this system is linked to a wide variety of skin diseases. Therefore, the research conducted to date suggest that the modulation

of the ECS could be a promising target for skin disorders treatment.

Acknowledgments

This work was partially supported by grant SAF2017-87701-R to EM from the Ministry of the Economy and Competition (MINECO) co-financed with the European Union FEDER funds. InnoHealth Group and Emerald Health Pharmaceuticals also supported this work and had no further role in the decision to submit the paper for publication.

References

- [1] M. Styrzewska, A. Kulma, K. Ratajczak, R. Amarowicz, J. Szopa, Cannabinoid-like anti-inflammatory compounds from flax fiber, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 17 (3) (2012) 479–499.
- [2] E.B. Russo, History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet, *Chem. Biodivers.* 4 (8) (2007) 1614–1648.
- [3] E.J. Brand, Z. Zhao, Cannabis in Chinese medicine: are some traditional indications referenced in ancient literature related to cannabinoids? *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 108.
- [4] G. Appendino, S. Gibbons, A. Giana, A. Pagani, G. Grassi, M. Stavri, et al., Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study, *J. Nat. Prod.* 71 (8) (2008) 1427–1430.
- [5] Z. Krejci, [Hemp, (*Cannabis sativa*)-antibiotic drugs. II. Method & results of bacteriological experiments & preliminary clinical experience], *Pharmazie* 13 (3) (1958) 155–166.
- [6] E.L. Abel, Cannabis in the Ancient world, Marihuana: The First Twelve Thousand Years, Plenum Publishers, New York City, 1980, p. 1980.
- [7] R. Ramer, B. Hinz, Cannabinoids as anticancer drugs, *Adv. Pharmacol.* 80 (2017) 397–436.
- [8] L.J. Musselman, Figs, Dates, Laurel, and Myrrh: Plants of the Bible and the Quran, Timber Pr, Portland (OR), 2007.
- [9] I. Lozano, The therapeutic use of *Cannabis sativa* (L.) in Arabic medicine, *J. Cann. Ther.* 1 (2001) 63–70.
- [10] T. Biro, B.I. Toth, G. Hasko, R. Paus, P. Pacher, The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (8) (2009) 411–420.
- [11] B.K. Srivastava, R. Soni, J.Z. Patel, A. Joharapurkar, N. Sadhwani, S. Kshirsagar, et al., Hair growth stimulator property of thienyl substituted pyrazole carboxamide derivatives as a CB1 receptor antagonist with in vivo antiobesity effect, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (9) (2009) 2546–2550.
- [12] E.B. Russo, Cannabis and epilepsy: an ancient treatment returns to the fore, *Epilepsy Behav.* 70 (Pt B) (2017) 292–297.
- [13] A.W. Zuardi, History of cannabis as a medicine: a review, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 28 (2) (2006) 153–157.
- [14] R. Mechoulam, Y. Gaoni, A total synthesis of Δ^1 - Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the active constituent of Hashish, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 3273–3275.
- [15] L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.I. Bonner, Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 346 (6284) (1990) 561–564.
- [16] S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 365 (6441) (1993) 61–65.
- [17] W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, et al., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258 (5090) (1992) 1946–1949.
- [18] T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, K. Shinoda, K. Itoh, et al., 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 (1) (1995) 89–97.
- [19] C.E. Rockwell, N.T. Snider, J.T. Thompson, J.P. Vanden Heuvel, N.E. Kaminski, Interleukin-2 suppression by 2-arachidonoyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2, *Mol. Pharmacol.* 70 (1) (2006) 101–111.
- [20] M. Bouaboula, S. Hilairt, J. Marchand, L. Fajas, G. Le Fur, P. Casellas, Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation, *Eur. J. Pharmacol.* 517 (3) (2005) 174–181.
- [21] Y. Okamoto, J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai, N. Ueda, Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners, *J. Biol. Chem.* 279 (7) (2004) 5298–5305.
- [22] T. Bisogno, D. Melck, M. Bobrov, N.M. Gretskaya, V.V. Bezuglov, L. De Petrocellis, et al., N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabinimetic activity in vitro and in vivo, *Biochem. J.* 351 (Pt 3) (2000) 817–824.
- [23] V. Di Marzo, Endocannabinoids: synthesis and degradation, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160 (2008) 1–24.
- [24] V. Di Marzo, M. Bifulco, L. De Petrocellis, The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation, *Nat Rev Drug Discov.* 3 (9) (2004) 771–784.
- [25] J. Liu, B. Gao, F. Mirshahi, A.J. Sanyal, A.D. Khanolkar, A. Makriyannis, et al., Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells, *Biochem. J.* 346 (Pt 3) (2000) 835–840.
- [26] K. Mackie, Cannabinoid receptors: where they are and what they do, *J. Neuroendocrinol.* 20 (Suppl 1) (2008) 10–14.
- [27] M.L. Casanova, C. Blazquez, J. Martinez-Palacio, C. Villanueva, M.J. Fernandez-Acenero, J.W. Huffman, et al., Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors, *J. Clin. Invest.* 111 (1) (2003) 43–50.
- [28] E. Garcia-Gonzalez, E. Selvi, E. Balistreri, S. Lorenzini, R. Maggio, M.R. Natale, et al., Cannabinoids inhibit fibrogenesis in diffuse systemic sclerosis fibroblasts, *Rheumatology (Oxford)* 48 (9) (2009) 1050–1056.
- [29] S. Stander, M. Schmelz, D. Metz, T. Luger, R. Rukwied, Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin, *J. Dermatol. Sci.* 38 (3) (2005) 177–188.
- [30] B.I. Toth, N. Dobrosi, A. Dajnoki, G. Czifra, A. Olah, A.G. Szollosi, et al., Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1, *J. Invest. Dermatol.* 131 (5) (2011) 1095–1104.
- [31] J.D. Richardson, S. Kilo, K.M. Hargreaves, Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors, *Pain* 75 (1) (1998) 111–119.
- [32] M. Dvorak, A. Watkinson, F. McGlone, R. Rukwied, Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin, *Inflamm. Res.* 52 (6) (2003) 238–245.
- [33] V. Chiriac, C. Rapino, E. Talamonti, A. Leuti, M. Lanuti, A. Gueniche, et al., Anandamide suppresses proinflammatory T cell responses in vitro through type-1 cannabinoid receptor-mediated mTOR inhibition in human keratinocytes, *J. Immunol.* 197 (9) (2016) 3545–3553.
- [34] B.K. Lau, C.W. Vaughan, Targeting the endogenous cannabinoid system to treat neuropathic pain, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 28.
- [35] S. Oka, J. Wakui, S. Ikeda, S. Yanagimoto, S. Kishimoto, M. Gokoh, et al., Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice, *J. Immunol.* 177 (12) (2006) 8796–8805.
- [36] M. Maccarrone, M. Di Rienzo, N. Battista, V. Gasperi, P. Guerrieri, A. Rossi, et al., The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase, *J. Biol. Chem.* 278 (36) (2003) 33896–33903.
- [37] M. Pucci, N. Pasquariello, N. Battista, M. Di Tommaso, C. Rapino, F. Fezza, et al., Endocannabinoids stimulate human melanogenesis via type-1 cannabinoid receptor, *J. Biol. Chem.* 287 (19) (2012) 15466–15478.
- [38] V. Gasperi, D. Evangelista, V. Chiriac, F. Florenzano, I. Savini, S. Oddi, et al., 2-Arachidonoylglycerol modulates human endothelial cell/leukocyte interactions by controlling selectin expression through CB1 and CB2 receptors, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 51 (2014) 79–88.
- [39] R. Roche, L. Hoareau, S. Bes-Houtmann, M.P. Gonthier, C. Laborde, J.F. Baron, et al., Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes, *Histochem. Cell Biol.* 126 (2) (2006) 177–187.
- [40] K. Palumbo-Zerr, A. Horn, A. Distler, P. Zerr, C. Dees, C. Beyer, et al., Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1, *Ann. Rheum. Dis.* 71 (12) (2012) 2051–2054.
- [41] J.M. McPartland, Expression of the endocannabinoid system in fibroblasts and myofascial tissues, *J. Bodyw. Mov. Ther.* 12 (2) (2008) 169–182.
- [42] I.M. Wohlman, G.M. Composto, D.E. Heck, N.D. Heindel, C.J. Lacey, C.D. Guillon, et al., Mustard vesicants alter expression of the endocannabinoid system in mouse skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 303 (2016) 30–44.
- [43] E. Bodo, I. Kovacs, A. Telek, A. Varga, R. Paus, L. Kovacs, et al., Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2) (2004) 410–413.
- [44] P. Facer, M.A. Casula, G.D. Smith, C.D. Benham, I.P. Chessell, C. Bountra, et al., Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy, *BMC Neurol.* 7 (2007) 11.
- [45] X. Shi-wen, M. Eastwood, R.J. Stratton, C.P. Denton, A. Leask, D.J. Abraham, Rosiglitazone alleviates the persistent fibrotic phenotype of lesional skin scleroderma fibroblasts, *Rheumatology (Oxford)* 49 (2) (2010) 259–263.
- [46] C.N. Ellis, J. Varani, G.J. Fisher, M.E. Zeigler, H.A. Pershadsingh, S.C. Benson, et al., Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibit keratinocyte proliferation, *Arch. Dermatol.* 136 (5) (2000) 609–616.
- [47] H.Y. Kang, E. Chung, M. Lee, Y. Cho, W.H. Kang, Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes, *Br. J. Dermatol.* 150 (3) (2004) 462–468.
- [48] A. Dozza, B. Dezzo, B.I. Toth, A. Bacci, S. Poliska, E. Camera, et al., PPARgamma-mediated and arachidonic acid-dependent signaling is involved in differentiation and lipid production of human sebocytes, *J. Invest. Dermatol.* 134 (4) (2014) 910–920.
- [49] E.R. Mann, K.M. Smith, D. Bernardo, H.O. Al-Hassi, S.C. Knight, A.L. Hart, Review: skin and the immune system, *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* S2 (2012) 003.
- [50] S. Galiegue, S. Mary, J. Marchand, D. Dussosoy, D. Carriere, P. Carayon, et al., Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Eur. J. Biochem.* 232 (1) (1995) 54–61.
- [51] C. Montell, The TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* 2005 (272) (2005) re3.
- [52] J.W. Yun, J.A. Seo, Y.S. Jeong, I.H. Bae, W.H. Jang, J. Lee, et al., TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery, *J. Dermatol. Sci.* 62 (1) (2011) 8–15.
- [53] D.E. Clapham, TRP channels as cellular sensors, *Nature* 426 (6966) (2003) 517–524.
- [54] T. Numata, S. Kiyonaka, K. Kato, N. Takahashi, Y. Mori, Activation of TRP

- Channels in Mammalian Systems, TRP Channels, Boca Raton (FL), 2011.
- [55] C. Montell, Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels, *Sci. STKE* 2001 (90) (2001) re1.
 - [56] H. Wang, J. Siemens, TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism, *Temperature (Austin)* 2 (2) (2015) 178–187.
 - [57] C. Moore, R. Gupta, S.E. Jordt, Y. Chen, W.B. Liedtke, Regulation of pain and itch by TRP channels, *Neurosci. Bull.* 34 (1) (2018) 120–142.
 - [58] J.D. Brederson, P.R. Kym, A. Szallasi, Targeting TRP channels for pain relief, *Eur. J. Pharmacol.* 716 (1–3) (2013) 61–76.
 - [59] W.S. Shim, M.H. Tak, M.H. Lee, M. Kim, M. Kim, J.Y. Koo, et al., TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase, *J. Neurosci.* 27 (9) (2007) 2331–2337.
 - [60] P. Anand, K. Bley, Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch, *Br. J. Anaesth.* 107 (4) (2011) 490–502.
 - [61] V. Pinheiro Fde, J.G. Villarinho, C.R. Silva, S.M. Oliveira, V. Pinheiro Kde, D. Petri, et al., The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.* 747 (2015) 105–113.
 - [62] C. De Caro, R. Russo, C. Avagliano, C. Cristiano, A. Calignano, A. Aramini, et al., Antinociceptive effect of two novel transient receptor potential melastatin 8 antagonists in acute and chronic pain models in rat, *Br. J. Pharmacol.* 175 (10) (2018) 1691–1706.
 - [63] S. Stander, C. Moormann, M. Schumacher, J. Buddenkotte, M. Artuc, V. Shpacovitch, et al., Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures, *Exp. Dermatol.* 13 (3) (2004) 129–139.
 - [64] R. Atayan, D. Shander, N.V. Botchkareva, Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 129 (9) (2009) 2312–2315.
 - [65] M.J. Caterina, TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation, *ACS Chem. Neurosci.* 5 (11) (2014) 1107–1116.
 - [66] M. Denda, T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, M. Tominaga, Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis, *J. Invest. Dermatol.* 127 (3) (2007) 654–659.
 - [67] T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, S. Yonemura, A. Mizuno, M. Tominaga, The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes, *J. Biol. Chem.* 285 (24) (2010) 18749–18758.
 - [68] M. Denda, M. Tsutsumi, M. Goto, K. Ikeyama, S. Denda, Topical application of TRPA1 agonists and brief cold exposure accelerate skin permeability barrier recovery, *J. Invest. Dermatol.* 130 (7) (2010) 1942–1945.
 - [69] M. Denda, M. Tsutsumi, S. Denda, Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis, *Exp. Dermatol.* 19 (9) (2010) 791–795.
 - [70] X. Cheng, J. Jin, L. Hu, D. Shen, X.P. Dong, M.A. Samie, et al., TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation, *Cell* 141 (2) (2010) 331–343.
 - [71] M.D. Southall, T. Li, L.S. Gharibova, Y. Pei, G.D. Nicol, J.B. Travers, Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (1) (2003) 217–222.
 - [72] Y.M. Lee, S.M. Kang, S.R. Lee, K.H. Kong, J.Y. Lee, E.J. Kim, et al., Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice, *Arch. Dermatol. Res.* 303 (10) (2011) 727–736.
 - [73] P.M. Zygmunt, J. Petersson, D.A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, et al., Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide, *Nature* 400 (6743) (1999) 452–457.
 - [74] S.E. Jordt, D.M. Bautista, H.H. Chuang, D.D. McKemy, P.M. Zygmunt, E.D. Hogestatt, et al., Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature* 427 (6971) (2004) 260–265.
 - [75] D.R. Sagar, P.A. Smith, P.J. Millns, D. Smart, D.A. Kendall, V. Chapman, TRPV1 and CB1(1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat, *Eur. J. Neurosci.* 20 (1) (2004) 175–184.
 - [76] S. Maione, L. De Petrocellis, V. de Novellis, A.S. Moriello, S. Petrosino, E. Palazzo, et al., Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 150 (6) (2007) 766–781.
 - [77] P.M. Zygmunt, A. Ermund, P. Movahed, D.A. Andersson, C. Simonsen, B.A. Jonsson, et al., Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1, *PLoS One* 8 (12) (2013) e81618.
 - [78] L. De Petrocellis, V. Vellani, A. Schiano-Moriello, P. Marini, P.C. Magherini, P. Orlando, et al., Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325 (3) (2008) 1007–1015.
 - [79] N. Qin, M.P. Neepser, Y. Liu, T.L. Hutchinson, M.L. Lubin, C.M. Flores, TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons, *J. Neurosci.* 28 (24) (2008) 6231–6238.
 - [80] M.A. Engel, I. Izydorczyk, S.M. Mueller-Tribensee, C. Becker, M.F. Neurath, P.W. Reeh, Inhibitory CB1 and activating/desensitizing TRPV1-mediated cannabinoid actions on CGRP release in rodent skin, *Neuropeptides* 45 (3) (2011) 229–237.
 - [81] M.R. Schneider, R. Schmidt-Ullrich, R. Paus, The hair follicle as a dynamic mini-organ, *Curr. Biol.* 19 (3) (2009) R132–R142.
 - [82] R. Paus, E.A. Langan, S. Vidali, Y. Ramot, B. Andersen, Neuroendocrinology of the hair follicle: principles and clinical perspectives, *Trends Mol. Med.* 20 (10) (2014) 559–570.
 - [83] L.L. Murphy, R.M. Munoz, B.A. Adrian, M.A. Villanua, Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion, *Neurobiol. Dis.* 5 (6 Pt B) (1998) 432–446.
 - [84] A. Telek, T. Biro, E. Bodo, B.I. Toth, I. Borbiri, G. Kunos, et al., Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids, *FASEB J.* 21 (13) (2007) 3534–3541.
 - [85] E. Bodo, T. Biro, A. Telek, G. Czifra, Z. Griger, B.I. Toth, et al., A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control, *Am. J. Pathol.* 166 (4) (2005) 985–998.
 - [86] T. Al-Zaid, S. Vanderweil, A. Zembowicz, S. Lyle, Sebaceous gland loss and inflammation in scarring alopecia: a potential role in pathogenesis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 65 (3) (2011) 597–603.
 - [87] K. Kure, T. Isago, T. Hirayama, Changes in the sebaceous gland in patients with male pattern hair loss (androgenic alopecia), *J. Cosmet. Dermatol.* 14 (3) (2015) 178–184.
 - [88] W.J. Lee, H.W. Cha, H.J. Lim, S.J. Lee, D.W. Kim, The effect of sebocytes cultured from nevus sebaceus on hair growth, *Exp. Dermatol.* 21 (10) (2012) 796–798.
 - [89] N. Dobrosi, B.I. Toth, G. Nagy, A. Dozza, T. Geczy, L. Nagy, et al., Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling, *FASEB J.* 22 (10) (2008) 3685–3695.
 - [90] A. Olah, B.I. Toth, I. Borbiri, K. Sugawara, A.G. Szollosi, G. Czifra, et al., Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes, *J. Clin. Invest.* 124 (9) (2014) 3713–3724.
 - [91] R. Paus, M. Maurer, A. Slominski, B.M. Czarnetzki, Mast cell involvement in murine hair growth, *Dev. Biol.* 163 (1) (1994) 230–240.
 - [92] M. Maurer, E. Fischer, B. Handjiski, E. von Stebut, B. Algermissen, A. Bavandi, et al., Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen), *Lab. Invest.* 77 (4) (1997) 319–332.
 - [93] K. Sugawara, N. Zakany, T. Hundt, V. Emelianov, D. Tsuruta, C. Schafer, et al., Cannabinoid receptor 1 controls human mucosal-type mast cell degranulation and maturation in situ, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (1) (2013) 182–193.
 - [94] K. Sugawara, T. Biro, D. Tsuruta, B.I. Toth, A. Kromminga, N. Zakany, et al., Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (3) (2012) 726–738 e8.
 - [95] C. del Rio, C. Navarrete, J.A. Collado, M.L. Bellido, M. Gomez-Canas, M.R. Pazos, et al., The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and CB2 pathways, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21703.
 - [96] K.O. Jonsson, E. Persson, C.J. Fowler, The cannabinoid CB2 receptor selective agonist JWH133 reduces mast cell oedema in response to compound 48/80 in vivo but not the release of beta-hexosaminidase from skin slices in vitro, *Life Sci.* 78 (6) (2006) 598–606.
 - [97] J.W. Streilein, Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin, *J. Invest. Dermatol.* 71 (3) (1978) 167–171.
 - [98] P. Massi, A. Vaccani, D. Parolaro, Cannabinoids, immune system and cytokine network, *Curr. Pharm. Des.* 12 (24) (2006) 3135–3146.
 - [99] R. Tanasescu, C.S. Constantinescu, Cannabinoids and the immune system: an overview, *Immunobiology* 215 (8) (2010) 588–597.
 - [100] A. Olah, L. Ambrus, S. Nicolussi, J. Gertsch, V. Tubak, L. Kemeny, et al., Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo, *Exp. Dermatol.* 25 (4) (2016) 328–330.
 - [101] J.H. Lee, X. Hou, E. Kummari, A. Borazjani, M.J. Edelman, M.K. Ross, Endocannabinoid hydrolases in avian HD11 macrophages identified by chemoproteomics: inactivation by small-molecule inhibitors and pathogen-induced downregulation of their activity, *Mol. Cell. Biochem.* (2017).
 - [102] E. Gaffal, M. Cron, N. Glodde, T. Tuting, Anti-inflammatory activity of topical THC in DNF-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors, *Allergy* 68 (8) (2013) 994–1000.
 - [103] P. Kulig, S. Musiol, S.N. Freiburger, B. Schreiner, G. Gyulveszi, G. Russo, et al., IL-12 protects from psoriasisiform skin inflammation, *Nat. Commun.* 7 (2016) 13466.
 - [104] I.T. Harvima, G. Nilsson, Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity, *Acta Derm. Venereol.* 91 (6) (2011) 644–650.
 - [105] G. Nam, S.K. Jeong, B.M. Park, S.H. Lee, H.J. Kim, S.P. Hong, et al., Selective cannabinoid receptor-1 agonists regulate mast cell activation in an oxazolone-induced atopic dermatitis model, *Ann. Dermatol.* 28 (1) (2016) 22–29.
 - [106] D. Ziring, B. Wei, P. Velazquez, M. Schrage, N.E. Buckley, J. Braun, Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2, *Immunogenetics* 58 (9) (2006) 714–725.
 - [107] I. Matias, P. Pochard, P. Orlando, M. Salzet, J. Pestel, V. Di Marzo, Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells, *Eur. J. Biochem.* 269 (15) (2002) 3771–3778.
 - [108] G.J. Maestroni, The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein, *FASEB J.* 18 (15) (2004) 1914–1916.
 - [109] Y.H. Chang, S.T. Lee, W.W. Lin, Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids, *J. Cell. Biochem.* 81 (4) (2001) 715–723.
 - [110] G.L. Huber, V.E. Pochay, W. Pereira, J.W. Shea, W.C. Hinds, M.W. First, et al., Marijuana, tetrahydrocannabinol, and pulmonary antibacterial defenses, *Chest* 77 (3) (1980) 403–410.
 - [111] M.D. Roth, D.P. Tashkin, K.M. Whittaker, R. Choi, G.C. Baldwin, Tetrahydrocannabinol suppresses immune function and enhances HIV replication in the huPBL-SCID mouse, *Life Sci.* 77 (14) (2005) 1711–1722.
 - [112] T.K. Eisenstein, J.J. Meissler, Q. Wilson, J.P. Gaughan, M.W. Adler, Anandamide and Delta9-tetrahydrocannabinol directly inhibit cells of the immune system via CB2 receptors, *J. Neuroimmunol.* 189 (1–2) (2007) 17–22.

- [113] M. Duncan, M.A. Galic, A. Wang, A.P. Chambers, D.M. McCafferty, D.M. McKay, et al., Cannabinoid 1 receptors are critical for the innate immune response to TLR4 stimulation, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305 (3) (2013) R224–R231.
- [114] T. Edwards, N.U. Patel, A. Blake, S. Prabakaran, D. Reimer, S.R. Feldman, et al., Insights into future therapeutics for atopic dermatitis, *Expert Opin. Pharmacother.* 19 (3) (2018) 265–278.
- [115] A. Wollenberg, A. Seba, A.S. Antal, Immunological and molecular targets of atopic dermatitis treatment, *Br. J. Dermatol.* 170 (Suppl 1) (2014) 7–11.
- [116] M.J. Cork, S.G. Danby, Y. Vasilopoulos, J. Hadgraft, M.E. Lane, M. Moustafa, et al., Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.* 129 (8) (2009) 1892–1908.
- [117] E. Gaffal, N. Glodde, M. Jakobs, T. Bald, T. Tuting, Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes attenuate fluorescein isothiocyanate-induced mouse atopic-like dermatitis, *Exp. Dermatol.* 23 (6) (2014) 401–406.
- [118] T. Roelands, C. Heughebaert, S. Bredif, C. Giddelo, C. Baudouin, P. Msika, et al., Cannabinoid receptors 1 and 2 oppositely regulate epidermal permeability barrier status and differentiation, *Exp. Dermatol.* 21 (9) (2012) 688–693.
- [119] H.J. Kim, B. Kim, B.M. Park, J.E. Jeon, S.H. Lee, S. Mann, et al., Topical cannabinoid receptor 1 agonist attenuates the cutaneous inflammatory responses in oxazolone-induced atopic dermatitis model, *Int. J. Dermatol.* 54 (10) (2015) e401–e408.
- [120] M. Karsak, E. Gaffal, R. Date, L. Wang-Eckhardt, J. Rehnelt, S. Petrosino, et al., Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system, *Science* 316 (5830) (2007) 1494–1497.
- [121] S. Petrosino, M. Vaia, R. Verde, T. Iuvone, V. Di Marzo, Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a non-psychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2018).
- [122] T. Maekawa, H. Nojima, Y. Kuraishi, K. Aisaka, The cannabinoid CB2 receptor inverse agonist JTE-907 suppresses spontaneous itch-associated responses of NC mice, a model of atopic dermatitis, *Eur. J. Pharmacol.* 542 (1–3) (2006) 179–183.
- [123] S. Petrosino, L. Cristino, M. Karsak, E. Gaffal, N. Ueda, T. Tuting, et al., Protective role of palmitoylethanolamide in contact allergic dermatitis, *Allergy* 65 (6) (2010) 698–711.
- [124] M. Vaia, S. Petrosino, D. De Filippis, L. Negro, A. Guarino, R. Carnuccio, et al., Palmitoylethanolamide reduces inflammation and itch in a mouse model of contact allergic dermatitis, *Eur. J. Pharmacol.* 791 (2016) 669–674.
- [125] A.C. Kendall, A. Nicolaou, Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity, *Prog. Lipid Res.* 52 (1) (2013) 141–164.
- [126] T. Biedermann, Y. Skabytska, S. Kaesler, T. Volz, Regulation of T cell immunity in atopic dermatitis by microbes: the Yin and Yang of cutaneous inflammation, *Front. Immunol.* 6 (2015) 353.
- [127] M. Yuan, S.M. Kiertscher, Q. Cheng, R. Zoumalan, D.P. Tashkin, M.D. Roth, Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells, *J. Neuroimmunol.* 133 (1–2) (2002) 124–131.
- [128] M.T. Cencioni, V. Chiurciu, G. Catanzaro, G. Borsellino, G. Bernardi, L. Battistini, et al., Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors, *PLoS One* 5 (1) (2010) e8688.
- [129] T.W. Klein, C. Newton, K. Larsen, J. Chou, I. Perkins, L. Lu, et al., Cannabinoid receptors and T helper cells, *J. Neuroimmunol.* 147 (1–2) (2004) 91–94.
- [130] C. Borner, M. Smida, V. Holt, B. Schraven, J. Kraus, Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling, *J. Biol. Chem.* 284 (51) (2009) 35450–35460.
- [131] A. Tsuchisaka, M. Furumura, T. Hashimoto, Cytokine regulation during epidermal differentiation and barrier formation, *J. Invest. Dermatol.* 134 (5) (2014) 1194–1196.
- [132] A.H. Norooznezad, F. Norooznezad, Cannabinoids: possible agents for treatment of psoriasis via suppression of angiogenesis and inflammation, *Med. Hypotheses* 99 (2017) 15–18.
- [133] E. Ogawa, Y. Sato, A. Minagawa, R. Okuyama, Pathogenesis of psoriasis and development of treatment, *J. Dermatol.* 45 (3) (2018) 264–272.
- [134] A. Chiricozzi, R. Pitocco, R. Saraceno, S.P. Nistico, A. Giunta, S. Chimenti, New topical treatments for psoriasis, *Expert Opin. Pharmacother.* 15 (4) (2014) 461–470.
- [135] M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, G. Hasko, J.W. Huffman, K. Mackie, P. Pacher, CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2) (2008) 347–357.
- [136] P. Nagarkatti, R. Pandey, S.A. Rieder, V.L. Hegde, M. Nagarkatti, Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs, *Future Med. Chem.* 1 (7) (2009) 1333–1349.
- [137] P. Fuschioti, Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis, *Immunotargets Ther.* 5 (2016) 21–35.
- [138] D. Pattanaik, M. Brown, B.C. Postlethwaite, A.E. Postlethwaite, Pathogenesis of systemic sclerosis, *Front. Immunol.* 6 (2015) 272.
- [139] A. Guillot, N. Hamdaoui, A. Bizy, K. Zoltani, R. Souktani, E.S. Zafrani, et al., Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver, *Hepatology* 59 (1) (2014) 296–306.
- [140] S. O'Reilly, T. Huggle, J.M. van Laar, T cells in systemic sclerosis: a reappraisal, *Rheumatology (Oxford)* 51 (9) (2012) 1540–1549.
- [141] T.R. Radstake, L. van Bon, J. Broen, A. Hussiani, R. Hesselstrand, D.M. Wuttge, et al., The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes, *PLoS One* 4 (6) (2009) e5903.
- [142] B.L. Gruber, Mast cells in the pathogenesis of fibrosis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 5 (2) (2003) 147–153.
- [143] T.A. Wynn, L. Barron, Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin. Liver Dis.* 30 (3) (2010) 245–257.
- [144] Y. Zhao, Z. Yuan, Y. Liu, J. Xue, Y. Tian, W. Liu, et al., Activation of cannabinoid CB2 receptor ameliorates atherosclerosis associated with suppression of adhesion molecules, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55 (3) (2010) 292–298.
- [145] M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, G. Hasko, P. Pacher, Cannabinoid CB1 receptor inhibition decreases vascular smooth muscle migration and proliferation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (4) (2008) 1248–1252.
- [146] C.P. Stanley, W.H. Hind, C. Tufarelli, S.E. O'Sullivan, The endocannabinoid anandamide causes endothelium-dependent vasorelaxation in human mesenteric arteries, *Pharmacol. Res.* 113 (Pt A) (2016) 356–363.
- [147] W.S. Ho, C.R. Hiley, Vasorelaxant activities of the putative endocannabinoid viridhamine in rat isolated small mesenteric artery, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (7) (2004) 869–875.
- [148] A. Jelaska, J.H. Korn, Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis, *Arthritis Rheum.* 43 (10) (2000) 2230–2239.
- [149] M.P. Lim, L.A. Devi, R. Rozenfeld, Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e170.
- [150] S.V. Siegmund, H. Uchinami, Y. Osawa, D.A. Brenner, R.F. Schwabe, Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells, *Hepatology* 41 (5) (2005) 1085–1095.
- [151] S. Marquart, P. Zerr, A. Akhmetshina, K. Palumbo, N. Reich, M. Tomcik, et al., Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis, *Arthritis Rheum.* 62 (11) (2010) 3467–3476.
- [152] A. Servetaz, N. Kaviani, C. Nicco, V. Deveaux, C. Chereau, A. Wang, et al., Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis, *Am. J. Pathol.* 177 (1) (2010) 187–196.
- [153] A. Akhmetshina, C. Dees, N. Busch, J. Beer, K. Sarter, J. Zwerina, et al., The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis, *Arthritis Rheum.* 60 (4) (2009) 1129–1136.
- [154] J. Munoz-Luque, J. Ros, G. Fernandez-Varo, S. Tugues, M. Morales-Ruiz, C.E. Alvarez, et al., Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2) (2008) 475–483.
- [155] E.G. Gonzalez, E. Selvi, E. Balistreri, A. Akhmetshina, K. Palumbo, S. Lorenzini, et al., Synthetic cannabinoid ajulemic acid exerts potent antifibrotic effects in experimental models of systemic sclerosis, *Ann. Rheum. Dis.* 71 (9) (2012) 1545–1551.
- [156] Y. Okada, P.S. Reinach, K. Shirai, A. Kitano, W.W. Kao, K.C. Flanders, et al., TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice, *Am. J. Pathol.* 178 (6) (2011) 2654–2664.
- [157] M. Wu, D.S. Melichian, E. Chang, M. Warner-Blankenship, A.K. Ghosh, J. Varga, Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Am. J. Pathol.* 174 (2) (2009) 519–533.
- [158] X. Yang, L. Wang, T. Chen, D. Hodge, J. Resau, L. DaSilva, et al., Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT, *J. Biol. Chem.* 18 (275(7)) (2000) 4541–4544.
- [159] L. Klotz, S. Burgdorf, I. Dani, K. Saijo, J. Flossdorf, S. Hucke, et al., The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity, *J. Exp. Med.* 206 (10) (2009) 2079–2089.
- [160] L.H. Wang, X.Y. Yang, X. Zhang, J. Huang, J. Hou, J. Li, et al., Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells, *Immunity* 20 (2) (2004) 205–218.
- [161] B.V. Park, F. Pan, The role of nuclear receptors in regulation of Th17/Treg biology and its implications for diseases, *Cell. Mol. Immunol.* 12 (5) (2015) 533–542.
- [162] L. Szeles, D. Torocsik, L. Nagy, PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* 1771 (8) (2007) 1014–1030.
- [163] C. Jiang, A.T. Ting, B. Seed, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature* 391 (6662) (1998) 82–86.
- [164] M. Ricote, A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, C.K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* 391 (6662) (1998) 79–82.
- [165] J.S. Welch, M. Ricote, T.E. Akiyama, F.J. Gonzalez, C.K. Glass, PPARgamma and PPARDelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (11) (2003) 6712–6717.
- [166] A. Chawla, Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, R.M. Evans, PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation, *Nat. Med.* 7 (1) (2001) 48–52.
- [167] A.K. Ghosh, S. Bhattacharyya, J. Wei, S. Kim, Y. Barak, Y. Mori, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator, *FASEB J.* 23 (9) (2009) 2968–2977.
- [168] A.T. Dantas, M.C. Pereira, M.J. de Melo Rego, L.F. da Rocha Jr., R. Pitta Ida, C.D. Marques, et al., The role of PPAR gamma in systemic sclerosis, *PPAR Res.* 2015 (2015) 124624.
- [169] J. Wei, S. Bhattacharyya, J. Varga, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: innate protection from excessive fibrogenesis and potential therapeutic target in systemic sclerosis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 22 (6) (2010) 671–676.
- [170] J.A. Lo, D.E. Fisher, The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics, *Science* 346 (6212) (2014) 945–949.

- [171] C. Karimkhani, A.C. Green, T. Nijsten, M.A. Weinstock, R.P. Dellavalle, M. Naghavi, et al., The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015, *Br. J. Dermatol.* 177 (1) (2017) 134–140.
- [172] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2018, *CA Cancer J. Clin.* 68 (1) (2018) 7–30.
- [173] H.E. Kanavy, M.R. Gerstenblith, Ultraviolet radiation and melanoma, *Semin. Cutan. Med. Surg.* 30 (4) (2011) 222–228.
- [174] W. Hall, M. Christie, D. Currow, Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation, *Lancet Oncol.* 6 (1) (2005) 35–42.
- [175] S. Sailler, K. Schmitz, E. Jager, N. Ferreiros, S. Wicker, K. Zschiebsch, et al., Regulation of circulating endocannabinoids associated with cancer and metastases in mice and humans, *Oncoscience* 1 (4) (2014) 272–282.
- [176] C. Blazquez, A. Carracedo, L. Barrado, P.J. Real, J.L. Fernandez-Luna, G. Velasco, et al., Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma, *FASEB J.* 20 (14) (2006) 2633–2635.
- [177] D. Zheng, A.M. Bode, Q. Zhao, Y.Y. Cho, F. Zhu, W.Y. Ma, et al., The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development, *Cancer Res.* 68 (10) (2008) 3992–3998.
- [178] C. Blazquez, L. Gonzalez-Feria, L. Alvarez, A. Haro, M.L. Casanova, M. Guzman, Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas, *Cancer Res.* 64 (16) (2004) 5617–5623.
- [179] S. Sarfaraz, F. Afaq, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer, *Cancer Res.* 65 (5) (2005) 1635–1641.
- [180] C.W. Michalski, F.E. Oti, M. Erkan, D. Sauliunaite, F. Bergmann, P. Pacher, et al., Cannabinoids in pancreatic cancer: correlation with survival and pain, *Int. J. Cancer* 122 (4) (2008) 742–750.
- [181] A.A. Izzo, M. Camilleri, Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer, *Pharmacol. Res.* 60 (2) (2009) 117–125.
- [182] M. Bifulco, C. Laezza, S. Pisanti, P. Gazzo, Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy, *Br. J. Pharmacol.* 148 (2) (2006) 123–135.
- [183] N. Glodde, M. Jakobs, T. Bald, T. Tuting, E. Gaffal, Differential role of cannabinoids in the pathogenesis of skin cancer, *Life Sci.* 138 (2015) 35–40.
- [184] S. Hart, O.M. Fischer, A. Ullrich, Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor, *Cancer Res.* 64 (6) (2004) 1943–1950.
- [185] J.L. Armstrong, D.S. Hill, C.S. McKee, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, I. Lopez-Valero, et al., Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death, *J. Invest. Dermatol.* 135 (6) (2015) 1629–1637.
- [186] J. Hasko, C. Fazakas, J. Molnar, A. Nyul-Toth, H. Herman, A. Hermenean, et al., CB2 receptor activation inhibits melanoma cell transmigration through the blood-brain barrier, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (5) (2014) 8063–8074.
- [187] R.T. Van Dross, Metabolism of anandamide by COX-2 is necessary for endocannabinoid-induced cell death in tumorigenic keratinocytes, *Mol. Carcinog.* 48 (8) (2009) 724–732.
- [188] C. Kuc, A. Jenkins, R.T. Van Dross, Arachidonoyl ethanolamide (AEA)-induced apoptosis is mediated by J-series prostaglandins and is enhanced by fatty acid amide hydrolase (FAAH) blockade, *Mol. Carcinog.* 51 (2) (2012) 139–149.
- [189] B. Adinolfi, A. Romanini, A. Vanni, E. Martinotti, A. Chicca, S. Fogli, et al., Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells, *Eur. J. Pharmacol.* 718 (1–3) (2013) 154–159.
- [190] E. Soliman, R. Van Dross, Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: receptor-independent endocannabinoid signaling, *Mol. Carcinog.* 55 (11) (2016) 1807–1821.
- [191] L. Hamtiaux, J. Masquelier, G.G. Muccioli, C. Bouzin, O. Feron, B. Gallez, et al., The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action, *BMC Cancer* 12 (2012) 92.
- [192] M. Guzman, M.J. Duarte, C. Blazquez, J. Ravina, M.C. Rosa, I. Galve-Roperth, et al., A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme, *Br. J. Cancer* 95 (2) (2006) 197–203.
- [193] M. Foroughi, G. Henderson, M.A. Sargent, P. Steinbok, Spontaneous regression of septum pellucidum/forniceal pilocytic astrocytomas—possible role of Cannabis inhalation, *Childs Nerv. Syst.* 27 (4) (2011) 671–679.
- [194] Y. Singh, C. Bali, Cannabis extract treatment for terminal acute lymphoblastic leukemia with a Philadelphia chromosome mutation, *Case Rep. Oncol.* 6 (3) (2013) 585–592.
- [195] L. De Petrocellis, M. Nabissi, G. Santoni, A. Ligresti, Actions and regulation of ionotropic cannabinoid receptors, *Adv. Pharmacol.* 80 (2017) 249–289.
- [196] L. De Petrocellis, A. Ligresti, A.S. Moriello, M. Allara, T. Bisogno, S. Petrosino, et al., Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes, *Br. J. Pharmacol.* 163 (7) (2011) 1479–1494.
- [197] A.M. Patwardhan, N.A. Jeske, T.J. Price, N. Gamper, A.N. Akopian, K.M. Hargreaves, The cannabinoid WIN 55,212–2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (30) (2006) 11393–11398.
- [198] O. Gouin, K. L'Herondelle, N. Lebonvallet, C. Le Gall-Ianotto, M. Sakka, V. Buhe, et al., TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization, *Protein Cell.* 8 (9) (2017) 644–661.
- [199] S. Hassan, K. Eldeeb, P.J. Millns, A.J. Bennett, S.P. Alexander, D.A. Kendall, Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation, *Br. J. Pharmacol.* 171 (9) (2014) 2426–2439.
- [200] T. Ishii, K. Uchida, S. Hata, M. Hata, T. Kita, Y. Miyake, et al., TRPV2 channel inhibitors attenuate fibroblast differentiation and contraction mediated by keratinocyte-derived TGF-beta1 in an in vitro wound healing model of rats, *J. Dermatol. Sci.* 90 (3) (2018) 332–342.
- [201] N. Imamachi, G.H. Park, H. Lee, D.J. Anderson, M.I. Simon, A.I. Basbaum, et al., TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (27) (2009) 11330–11335.
- [202] S.R. Wilson, K.A. Gerhold, A. Bifulco-Fisher, Q. Liu, K.N. Patel, X. Dong, et al., TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch, *Nat. Neurosci.* 14 (5) (2011) 595–602.
- [203] S. Petrosino, A. Schiano Moriello, S. Cerrato, M. Fusco, A. Puigdemont, L. De Petrocellis, et al., The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels, *Br. J. Pharmacol.* 173 (7) (2016) 1154–1162.
- [204] S. Cerrato, P. Brazis, M.F. Della Valle, A. Miolo, S. Petrosino, V. Di Marzo, et al., Effects of palmitoylethanolamide on the cutaneous allergic inflammatory response in *Ascaris* hypersensitive Beagle dogs, *Vet J.* 191 (3) (2012) 377–382.
- [205] A. Olah, A. Markovics, J. Szabo-Papp, P.T. Szabo, C. Stott, C.C. Zouboulis, et al., Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment, *Exp. Dermatol.* 25 (9) (2016) 701–707.

